

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin  
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main  
Med. Klinik III (Hämatologie und Onkologie)  
Direktor: Prof. Dr. med. D. Hoelzer

**Effekte des ABL-Tyrosinkinase-Inhibitors STI571  
auf BCR-ABL positive Blasten bei der akuten  
lymphatischen Leukämie**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Tilmann Brauns aus Frankfurt am Main  
Frankfurt am Main, 2003

**Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter**

**Referent: PD Dr. O. Ottmann**

**Koreferent: Prof. Dr. E. Seifried**

**Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2004**

1	Einleitung .....	1
1.1	Das Philadelphia-Chromosom.....	1
1.2	Die ABL-Kinase und das BCR-ABL-Protein .....	3
1.3	Der Einfluss von BCR-ABL auf Signaltransduktionskaskaden .....	4
1.4	Die Leukämogenese durch BCR-ABL .....	6
1.5	Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämie .....	7
1.6	Prognose, Klinik und Therapie der Ph+ALL .....	8
1.7	Die Entwicklung des ABL-Tyrosinkinase-Inhibitors STI571 .....	10
1.8	Fragestellung.....	12
2	Materialien.....	13
2.1	Allgemeine Laborgeräte und Materialien.....	13
2.2	Zellkultur, 7AAD-Apoptose-Assay, H3-Thymidin-Assay: Medien, Chemikalien und Enzyme.....	14
2.3	Molekularbiologie: Materialien, Geräte, Chemikalien .....	15
2.4	Zelllinien .....	16
2.5	Primäre Blasten von Patienten mit ALL.....	17
3	Methoden .....	19
3.1	Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer.....	19
3.2	Durchführung der Zählung: .....	19
3.3	Bestimmung der Zellviabilität durch Trypanblau-Exklusion .....	19
3.4	Durchführung der Viabilitätsbestimmung: .....	20
3.5	Isolation mononukleärer Zellen .....	20
3.6	Kultivierung der Zelllinien BV 173, SD1 und SEM.....	21
3.7	Kultivierung der Zelllinie NIH3T3.....	22
3.8	Serumfreie Zellkulturen .....	23
3.9	Kultivierung primärer ALL-Blasten.....	24
3.10	In vitro Purging und Effekte von STI571 auf frühe leukämische Progenitorzellen .....	25
3.11	Klonogene Assays für hämatopoetische Stammzellen .....	27
3.12	Long-Term Culture-Initiating Cell Assays (LTCIC) .....	27
3.13	3H Thymidin-Proliferationsassay.....	28
3.14	Durchflußzytometrie .....	29
3.15	7-Aminoactinomycin D (7AAD) –Apoptose-Assay.....	31

3.16	Reverse Transskription und Polymerasekettenreaktion .....	31
3.16.1	Grundlagen .....	31
3.16.2	RNA-Isolation mit RNAzol .....	32
3.16.3	RNA-Fällung .....	33
3.16.4	c-DNA-Synthese (reverse Transskription) .....	33
3.16.5	$\beta$ -Aktin-PCR .....	34
3.16.6	BCR-ABL-PCR .....	35
3.17	„Nested“ PCR .....	36
3.18	Elektrophorese im Agarosegel .....	37
4	Ergebnisse .....	39
4.1	Biologische Effekte des ABL Kinase-Inhibitors STI571 auf die Zelllinien BV173 und SEM .....	39
4.1.1	Wachstum der Zelllinien BV173 und SEM in Kultur mit STI571 .....	39
4.1.2	Ergebnisse der 3H-Thymidin-Inkorporationsversuche .....	39
4.1.3	Ergebnisse der 7AAD-Apoptose-Assays .....	40
4.2	Wirkung des Kinase-Inhibitors STI571 auf die Zelllinie SD1 .....	44
4.3	Versuch der Selektion resistenter Subclone .....	45
4.3.1	Versuch der Selektion resistenter Subclone mit BV173 .....	45
4.3.2	Versuch der Selektion resistenter Subclone mit SD1 .....	45
4.4	Wirkung von STI571 auf primäre leukämische Blasten .....	48
4.4.1	Primäre Kulturphase Ph+ ALL-Blasten mit STI571 .....	50
4.4.2	Sekundäre Kulturphase Ph+ ALL-Lymphoblasten ohne STI571 .....	51
4.4.3	RT-PCR-Analyse der BCR-ABL-Expression .....	51
4.4.4	RT-PCR-Analyse der Patienten in Zustand der kompletten Remission .....	52
4.5	Ergebnisse der „nested“ BCR-ABL-PCR .....	58
4.6	Einfluß von STI571 auf normale hämatopoetische Stammzellen .....	60
5	Diskussion .....	63
5.1	Versuche mit Zelllinien .....	63
5.2	Versuche mit primären ALL-Blasten .....	65
5.3	Beurteilung .....	69
5.4	Konsequenzen .....	70
6	Zusammenfassung .....	73
7	Literatur .....	74

8   Abbildungsverzeichnis..... 86

9   Tabellenverzeichnis..... 87

## **Abkürzungen**

<b>μM</b>	<b>Mikromol</b>
<b>7AAD</b>	<b>7-Aminoactinomycin D</b>
<b>Abb.</b>	<b>Abbildung</b>
<b>ALL</b>	<b>Akute lymphatische Leukämie</b>
<b>BCR</b>	<b>Breakpoint cluster region</b>
<b>BSA</b>	<b>Bovine serum albumin</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster of differentiation</b>
<b>CFU</b>	<b>Colony forming units</b>
<b>CML</b>	<b>Chronisch myeloische Leukämie</b>
<b>CR</b>	<b>Complete Remission</b>
<b>DNA</b>	<b>Desoxyribonucleic acid</b>
<b>DX</b>	<b>Diagnose</b>
<b>EGFR</b>	<b>Epidermal Growth Factor Receptor</b>
<b>EGIL</b>	<b>European Group for Immunological Characterization of Leukemias</b>
<b>FACS</b>	<b>Fluorescence Associated Cell Scan</b>
<b>FCS</b>	<b>Fetal Calf Serum</b>
<b>GMALL</b>	<b>German Multicentric ALL Study</b>
<b>IGF-1R</b>	<b>Insulin like Growth Factor Receptor</b>
<b>IL</b>	<b>Interleukin</b>
<b>Kb</b>	<b>Kilobasen</b>
<b>KD</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>KM</b>	<b>Knochenmark</b>
<b>LTCIC</b>	<b>Long Term Culture Initiating Cells Assay</b>
<b>M-BCR-ABL</b>	<b>Major BCR-ABL (p210)</b>
<b>m-BCR-ABL</b>	<b>Minor BCR-ABL (p190)</b>
<b>mRNA</b>	<b>Messenger Ribonucleic Acid</b>
<b>Oligo-dt</b>	<b>Oligodesoxythymidylat</b>
<b>PB</b>	<b>Peripheral Blood</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase Chain Reaction</b>
<b>PDGF-R</b>	<b>Platelet Derived Growth Factor Receptor</b>
<b>Ph+ALL</b>	<b>Philadelphia Chromosom positive ALL</b>

Ph+CML	Philadelphia Chromosom positive CML
Ph-Chromosom	Philadelphia Chromosom
Pi3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-kinase
REL	Relapse
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
S-Phase	Synthese Phase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tab.	Tabelle
TCR	T-Cell Receptor
UpM	Umdrehungen pro Minute





# 1 Einleitung

## 1.1 Das Philadelphia-Chromosom

Das Philadelphia-Chromosom (Ph-Chromosom) ist eine der ersten Chromosomen-Abnormalitäten, die mit neoplastischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnte. Bereits 1960 beschrieben Nowell und Hungerford [Nowell PC et al., 1960] ein abnormales Chromosom 22 in den leukämischen Zellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML). Die Assoziation zwischen dem Auftreten des Ph-Chromosoms und der CML ist heute allgemein anerkannt: mehr als 95% aller Patienten mit CML weisen das abnormale Chromosom auf; weiterhin konnte bei einigen der verbleibenden 5% die Philadelphia-Translokation mit Hilfe molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden [de Klein A et al., 1982; Bartram CR et al., 1983].

Neben der CML wurde das Ph-Chromosom auch bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) beschrieben, wobei etwa 17-25% der erwachsenen Patienten und 2-6% der erkrankten Kinder das abnorme Chromosom aufweisen [Gleisner et al., 2002, Priest JR et al., 1980; Champlin RE et al., 1985].

Zytogenetisch betrachtet handelt es sich bei dem Ph-Chromosom um eine reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosome 22 und 9 [Rowley JD et al., 1973]. Hierbei kommt es zur Translokation des Onkogens ABL von Chromosom 9 auf Chromosom 22 [de Klein A et al., 1982]. ABL besitzt 2 Exons (1B und 1A) [Ben-neriah Y et al., 1986]. Der Bruchpunkt auf Chromosom 9 liegt meist in dem Intron zwischen Exon 1A und Exon 1B [Bernards A et al., 1987]. Somit wird nur das Exon 1B des ABL-Gens auf Chromosom 22 übertragen, die ABL eigene Promotorregion und das Exon 1A verbleiben auf dem Chromosom 9.

Der Strangbruch auf Chromosom 22 findet innerhalb des Gens BCR statt. Hierbei weist der Bruchpunkt eine weitgehend konstante Lokalisation auf, die als *Breakpoint Cluster Region* bezeichnet wird [Groffen J et al., 1984]. Nach dem Strangbruch verbleiben noch die Promotorregion und eine variable Anzahl Exons von BCR auf Chromosom 22. Durch die Anlagerung des ABL-Fragmentes von Chromosom 9 an das verbleibende Fragment von BCR kommt es zur Bildung eines BCR-ABL-Konstrukts.

Das durch den Strangbruch entstandene freie Fragment von BCR wird auf Chromosom 9 übertragen, wobei es zur reziproken Translokation kommt. Das pathogenetisch entscheidende Ereignis ist die Transposition des ABL-Fragmentes von Chromosom 9 auf Chromosom 22. Durch das Zusammentreffen der Gene BCR und ABL, von denen BCR seine ursprüngliche Promotorregion noch enthält, und ABL seine Promotorregion verloren hat, kommt es zu einer durch BCR gesteuerten 200fach stärkeren Expression des BCR-ABL-Fusionsproteins [Grosveld G et al., 1986; Shtivelman E et al., 1985; McWhirter et al., 1997].

Die Größe des BCR-ABL-Konstruktes variiert durch die unterschiedliche Lokalisation der Bruchpunkte auf Chromosom 22 innerhalb der Breakpoint Cluster Region. Enthält die entstehende mRNA lediglich das erste Exon von BCR, ist selbige 7kb lang und kodiert für ein Protein mit der Masse von 190 kD, das P190 genannt wird (minor BCR-ABL = m-BCR-ABL) [Chan LC et al., 1987].

Enthält die entstehende mRNA mehrere Exons von BCR, ist selbige ungefähr 8,5 kb lang und kodiert für ein 210 kD Protein, das p210 genannt wird (major BCR-ABL = M-BCR-ABL) [Stam K et al., 1985].

Interessanterweise findet sich die major Variante (M-BCR-ABL) fast ausschließlich in der Ph+CML, während die minor Form (m-BCR-ABL) fast ausschließlich in der Ph+ALL gefunden wird.

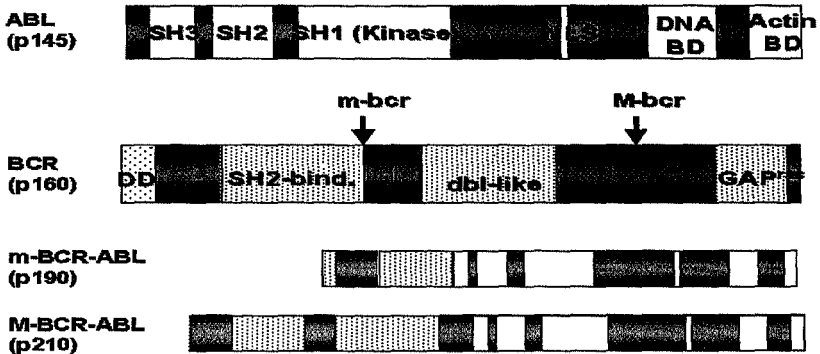


Abb. 1: Schematische Darstellung von ABL, BCR und der Bruchpunkte innerhalb der Breakpoint Cluster Region von BCR sowie der unterschiedlichen BCR-ABL-Konstrukte

## 1.2 Die ABL-Kinase und das BCR-ABL-Protein

Das normale Protein ABL gehört zu der Familie der tyrosinspezifischen Proteinkinasen. Innerhalb dieser Gruppe unterscheidet man membranständige und zytoplasmatische Tyrosinkinasen. Da ABL keine transmembrane oder extrazelluläre Domäne besitzt, zählt es zu den zytoplasmatischen oder Membran-assoziierten Tyrosinkinasen. Zur gleichen Gruppe zählt auch das Proto-Onkogen SRC, das in seiner Struktur Homologien zu ABL aufweist. ABL weist 2 amino-terminale Domänen auf, die SH2 und SH3 (SRC-Homologous Regions 2 and 3) genannt werden. Es wird vermutet, dass SH3 einen negativ regulativen Effekt auf ABL hat, da es nach Deletion von SH3 zur Aktivierung des Proteins kommt [Jackson P, Baltimore D, 1989]. SH2 und SH3 besitzen keine katalytische Wirkung. Die katalytische Wirkung von ABL befindet sich innerhalb der SH1-Domäne (Kinasen-Domäne). Im C-terminalen Bereich des Proteins befinden sich Bindungsdomänen für DNA und Aktin. Das BCR-ABL-Konstrukt führt durch die Fusion der N-terminalen BCR-Sequenzen mit ABL zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung der Tyrosinkinase-Aktivität. Die große Zahl der Protein-Protein-Interaktionsdomänen ermöglicht dem BCR-ABL-Protein verschiedene zelluläre Proteine, bekannter Signalwege zu phosphorylieren (STAT, Myc, Ras, cyclin D).

Der Tyrosinkinase Domäne kommt in Bezug auf die Funktion von BCR-ABL die entscheidende Rolle zu. Es konnte nachgewiesen werden, dass Kinase-inaktive BCR-ABL-Mutanten kein Wachstumsfaktor-unabhängiges Wachstum aufweisen.

### 1.3 Der Einfluss von BCR-ABL auf Signaltransduktionskaskaden

Die ABL-Kinase ist eine Proteintyrosinkinase, deren Aufgabe die Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen des Immunsystems ist [Levitzi A et al., 1985]. Im Normalfall werden die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen durch Zytokine und Wachstumsfaktoren kontrolliert und initiiert. Durch die Interaktion eines Zytokins mit seinem Rezeptor kommt es hierbei zur Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionskaskaden, die auf dem Weg der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Aminosäure Tyrosin bestimmter Signalproteine die Transskription verschiedener Gene bedingen, die nach Proteinexpression die Differenzierung, Proliferation oder Apoptose induzieren. Eine Familie von zytoplasmatischen Tyrosinkinase, die mit den verschiedenen Zytokinrezeptoren direkt assoziiert sind, werden als JAK-Kinasen bezeichnet. Nach Phosphorylierung des Zytokins an seinem Rezeptor kommt es zur Phosphorylierung der JAK-Kinasen, die hierauf mit der Phosphorylierung einer weiteren Gruppe von Proteinen den STAT-Molekülen (Signal Transducers and Activators of Transcription) beginnen. Die STAT-Moleküle sind eine Gruppe von Enzymen, die nach ihrer Phosphorylierung im Zellkern an spezifische DNA-Abschnitten binden und die Transskription bestimmter Gene induzieren.

Eine gesteigerte Aktivität von Rezeptortyrosinkinase, die Signale von der Zellmembran übertragen, oder eine gesteigerte Aktivität der intrazellulären Tyrosinkinase führt zu einer persistierenden Tyrosinphosphorylierung verschiedenster nachgeschalteter Signalkaskaden, die mit der Entstehung verschiedener Neoplasien in Verbindung gebracht wird. Im Falle der Ph+CML und der Ph+ALL kommt es durch das M-BCR-ABL bzw. m-BCR-ABL-Fusionsgen zur deregulierten Expression der BCR-ABL-Kinase. Dies führt zu einer Aktivierung von STAT 5 [Shuai K et al., 1996; de Groot RP et al., 1999]. Die Aktivierung von STAT 5 durch das BCR-ABL-Protein ist ein wesentlicher Faktor, der zur wachstumsfaktor- und zytokinunabhängigen Proliferation der Zelle führt [Hoover RR et al., 2001].

Außer der beschriebenen Aktivierung von STAT5 kommt es durch das BCR-ABL-Fusionsgen zur Aktivierung von STAT1 und STAT3 [Ilarai RL Jr et al., 1996].

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass es unter der Wirkung von BCR-ABL zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3-Kinase) kommt [Calabretta B et al., 1996, Skorski T et al., 1997]. Die PI3-Kinase besitzt eine wichtige Funktion in der Regelung der Apoptose. Bei Aktivierung phosphoryliert sie stromabwärts die AKT-Kinase. AKT induziert durch Phosphorylierung des Proteins BAD die Aktivität des BCL2-BCL-XL-Komplexes. Der BCL2-BCL-XL-Komplex verhindert durch die Inhibition der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien den Ablauf der Caspasenkaskade. Bei fehlender Aktivität der Caspasenkaskade, deren Aufgabe die Spaltung C-terminaler Asparaginsäureester von Bestandteilen der Kernlamina und des Zytoskeletts ist, kann die Apoptose nicht ablaufen.

Eine weitere Wirkung des BCR-ABL-Konstruktes ist die Aktivierung des RAS Pfades. Es sind verschiedene Signalwege beschrieben, über die die Aktivierung von RAS durch BCR-ABL möglich ist. Pendergast AM beschreibt eine Grb-2-bindende Domäne innerhalb des BCR-ABL-Proteins, die zur Aktivierung des Grb-2-SOS-Komplexes führt [Pendergast AM et al., 1993, Cortez D et al., 1996]. Hierbei bindet Grb2 an das phosphorylierte Tyrosin Y177 innerhalb der GRB-SH2-Binding-Domäne von BCR-ABL. Es resultiert die Phosphorylierung des Proteins RAS, das über eine zwischengeschaltete Kaskade von Proteinkinasen die MAP-Kinase phosphoryliert. Die MAP-Kinase phosphoryliert wiederum mehrere Transkriptionsfaktoren, die die Synthese verschiedener für den Zellzyklus essentieller Proteine bedingen und zur wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation beitragen [Sawyers CL et al., 1995]. Eine Aktivierung von RAS kann aber auch über das Protein CRKL erfolgen. Wie für GRB-2 existiert auch für CRKL eine Binding-Domäne innerhalb der BCR-ABL-Proteins, die zur Aktivierung des CRKL-SOS-Komplexes führt, der eine Aktivierung von RAS bedingt [ten Hoeve J et al., 1994].

Weitere Mechanismen der Aktivierung von RAS durch BCR-ABL wurden beschrieben und umfassen die Proteine Shc [Goga A et al., 1995; Puil L et al., 1994] und p120GAP-GTPase [Skorski T et al., 1994; Skorski T et al., 1993].

Die Aktivierung von RAS trägt zur wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation der Zelle bei [Hoover RR, Gerlach MJ, 2001].

Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der durch BCR-ABL aktivierten Signalfade.

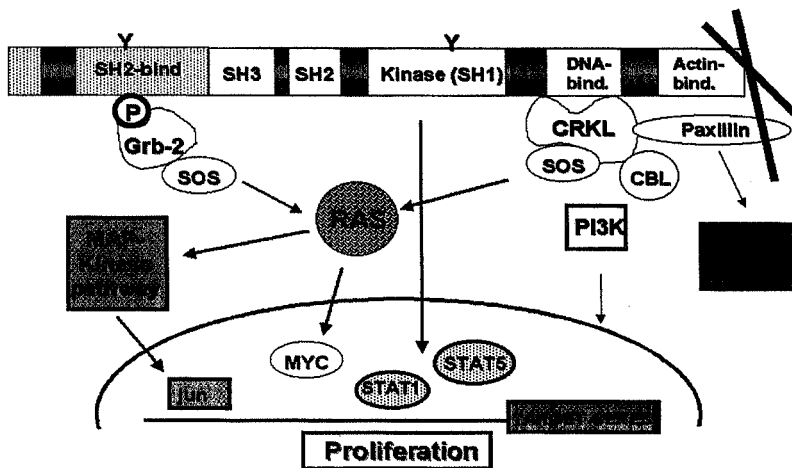


Abb. 2: Schematische Darstellung der durch BCR-ABL aktivierten Signalpfade. Über den GRB-2-SOS-Komplex kommt es zur Aktivierung von RAS und der stromabwärts liegenden MAP-Kinase sowie MYC. Eine Aktivierung von RAS ist auch über den CRKL-SOS-Komplex möglich. Weiterhin kommt es über die Phosphorylierung der JAK-Kinasen zur Aktivierung von STAT5 und 1. Zusätzlich wird die PI3-Kinase aktiviert.

#### 1.4 Die Leukämogenese durch BCR-ABL

Es gilt heute als allgemein anerkannt, dass BCR-ABL die entscheidende Bedeutung in der Pathogenese der Ph<sup>+</sup> CML und der Ph<sup>+</sup> ALL zukommt. Die Korrelation wurde durch Versuche mit Zelllinien und Maus-Modellen belegt.

Daley GQ beschreibt eine murine IL3 abhängige lymphoblastoide Zelllinie, die nach Transfektion mit M-BCR-ABL ein IL3-unabhängiges Wachstum aufweist [Daley GQ et al., 1988]. Mc Laughlin J berichtet, dass retrovirale Vektoren, die M-BCR-ABL oder m-BCR-ABL tragen, das Wachstum von unreifen lymphoiden Zellen stimulieren können. Hierbei wurde weiterhin beobachtet, dass das m-BCR-ABL-Konstrukt (P190) einen potenteren Stimulator für die Proliferation darstellt als das M-BCR-ABL-Konstrukt (p210) [Mc Laughlin J et al., 1989]. Es wird diskutiert, ob die höhere Aktivität des m-BCR-ABL im Vergleich zu der major Form pathogenetisch die Ausbildung des lymphatische Phänotyps bedingt.

Heisterkamp N gelang es 1990 ein für m-BCR-ABL transgenes Mausmodell zu etablieren. Hierbei konnte beobachtet werden, dass 80% der transgenen Mäuse im Zeitraum von weniger als 3 Monaten eine akute Leukämie entwickelten, die zum Tod der Mäuse führte [Heisterkamp N et al., 1990]. Transgene Mäuse, die das M-BCR-ABL Konstrukt (p210) tragen, entwickeln ebenfalls lymphoblastische Leukämien [Honda H et al., 1998 ; Voncken JW et. al., 1995]. Interessanterweise führt die universelle Expression von BCR-ABL nur in hämatopoetischen Zellen zu der Entwicklung von Malignomen. Neoplasien andere Organe konnten nicht beobachtet werden.

Die BCR-ABL zukommende zentrale Rolle in der Pathogenese der CML und BCR-ABL positiven ALL macht das Fusionsprotein zu einer äußerst interessanten Zielstruktur für die Entwicklung innovativer Therapien.

### 1.5 Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämie

Die Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämie kann nach morphologischen, zytochemischen und immunphänotypischen Parametern erfolgen. Da die Möglichkeiten der modernen Immunphänotypisierung eine wesentlich genauere Zuordnung der leukämischen Blasten zu bestimmten Reifungsgraden und Zellreihen zulassen, erfolgt aktuell die Klassifikation der ALL anhand immunphänotypischer Parametern.

Da Lymphozyten während ihrer Reifung verschiedene Oberflächenantigene exprimieren und wieder verlieren, ist es möglich anhand eines Reaktionsmusters der Zellen gegen bestimmte monoklonale Antikörper, einen Immunphänotyp zu definieren. Der Immunphänotyp lässt eine präzise Beurteilung des Reifungsstadium und der Zellreihenzugehörigkeit der Blasten zu, die klinisch von großer Bedeutung ist. Es wurden verschiedene Klassifikationsschemen für normale und leukämische Zellen entwickelt. Die aktuelle Klassifikation der ALL entsprechend der European Group for Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) zeigen Tabelle 1 [Bene MC et al., 1995]. Technische Aspekte, wie die Wahl der Antikörper, das gating der Zellpopulation sowie die Beurteilung der meist mittels Durchflußzytometrie erhobenen Daten sind von großer Bedeutung. Ein Antigen wird als positiv gewertet bei Nachweis auf >20% der untersuchten Blasten. Ausnahmen sind hierbei CD79a,

CD3 und anti MPO, die auch bei >10% untersuchter Blasten als positiv gewertet werden.

Das BCR-ABL-Konstrukt kommt vorwiegend bei der common-B-ALL und bei der Prae B-ALL vor, wobei fast ausschließlich der kleine Bruchpunkt von BCR-ABL gefunden wird.

<b>B-Linien ALL</b>	<b>CD19+ und/oder CD79a+ und/oder CD22+</b>
B-I ProB	Keine Expression weiterer B-Zell-Antigene
B-II common-ALL	CD10+
B-III PraeB-ALL	Zytoplasmatisches IgM
B-IV Reife B-ALL	Zytoplasmatisches oder membranständiges kappa oder lambda +
<b>T-Linien ALL</b>	<b>Zytoplasmatisches oder membran CD3 +</b>
T-I ProT-ALL	CD7+
T-II Prä-T-ALL	CD2+ und/oder CD5+ und/oder CD8+
T-III corticale-ALL	CD1a+
T-IV Reife T-ALL	Membranes CD3+, CD1a-
α/β + T-ALL (a)	Anti-TCR α/β+
γ/δ + T-ALL (b)	Anti-TCR γ/δ+

Tab. 1: Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämie entsprechend der European Group for Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)]

## 1.6 Prognose, Klinik und Therapie der Ph+ALL

Das Philadelphia Chromosom tritt innerhalb der akuten lymphatischen Leukämien ausschliesslich bei der B-Linien ALL auf. In der Gruppe der B-Linien ALL wird es am häufigsten bei der common ALL und der PreB ALL gefunden.

Die Inzidenz einer Philadelphia-Chromosom-positiven akuten lymphatischen Leukämie liegt bei 20% aller akuten lymphatischen Leukämien. Sie nimmt mit dem Alter zu und wird bei über 50-jährigen Patienten mit B-Linien-ALL mit mehr als 50% bemessen. Unter allen lymphatischen Leukämien stellt die Ph+ ALL die insgesamt prognostisch ungünstigste Subgruppe dar.

Histopathologisch betrachtet findet man im Blut und im Knochenmark der Patienten undifferenzierte Blasten mit atypischen Nukleolen und schmalem basophilen Zytoplasmasaum.



Klinisch werden die Patienten durch anfängliche Allgemeinsymptome wie Nachtschweiß, Fieber und Abgeschlagenheit auffällig. Später folgen Symptome verursacht durch die Insuffizienz der normalen Hämatopoese.

Dazu gehören:

- Anfälligkeit für Infektionen opportunistischer Dignität (durch Granulozytopenie)
- Beschwerden als Folge einer Anämie (Blässe, Müdigkeit, Dyspnoe)
- Blutungen infolge einer Thrombozytopenie

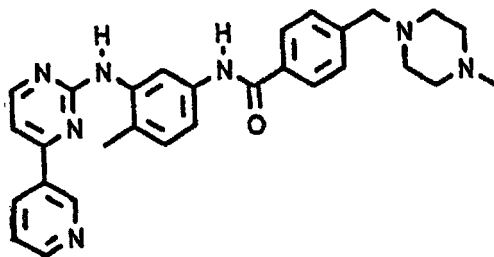
Häufig vorhandene weitere Symptome sind Lymphadenopathie, Splenomegalie, leukämische Haut- und Organinfiltrationen sowie auch eventuell Knochenschmerzen (vor allem bei Kindern).

In der deutschen multizentrischen ALL-Studie (GMALL) wurden bis jetzt über 200 Patienten mit Ph+ ALL behandelt. Nur etwa 9% der behandelten Patienten überlebten rezidivfrei trotz Intensivierung der Therapie. Ein Langzeitüberleben kann derzeit fast ausschließlich mit einer allogenen Knochenmark oder Stammzelltransplantation erreicht werden. Hierbei sind die Ergebnisse vielversprechend, aber ebenfalls deutlich schlechter als bei anderen Leukämieformen. Hinzu kommt das Problem, einen geeigneten Knochenmarkspender zu finden, der hohen Transplantations-assoziierte Mortalität, der Graft versus Host Krankheit und der Toxizität der Konditionierungstherapie. Des weiteren sind allogene Transplantationen bei älteren Patienten mit den derzeitigen Verfahren häufig nicht durchführbar. Die autologe Knochenmarkstransplantation erschien somit als alternativer Therapieansatz vor allem bei älteren Patienten als attraktiv. Vorteile sind hier die fehlende Graft versus Host disease, die geringere Transplantationsmortalität und die Verfügbarkeit des Transplantats. Allerdings treten bei dieser Form der Therapie häufig Rezidive auf, die man sich einerseits durch Kontamination des Transplantats mit residuellen leukämischen Blasten und andererseits durch den fehlenden Graft versus Leukämie-Effekt erklärt. Ein attraktiver Ansatzpunkt für die Verbesserung des Gesamtergebnisses einer autologen Stammzelltransplantation oder Knochenmarkstransplantation wäre hier, eine Optimierung der Verfahren zur Reduktion der im Transplantat vorhandenen residuellen leukämischen Zellen (Purging) zu erreichen [Martin H et al., 1995].

## 1.7 Die Entwicklung des ABL-Tyrosinkinase-Inhibitors STI571

Aufgrund seiner transformierenden Eigenschaften ist BCR-ABL eine sehr interessante Zielstruktur für innovative Therapien. Aus diesem Grund wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Anstrengungen unternommen, einen Kinase Inhibitor zu entwickeln, der möglichst spezifisch die ABL-Kinase hemmt. Ausgangspunkt waren die natürlichen Stoffe Quercetin, Genistein, Lavendustin A, Erbastatin und Herbimycin A, die Extrakte verschiedener Pilze darstellen, und von denen eine relativ unspezifische Hemmung verschiedener Phosphotyrosinkinasen bekannt ist. Auf Basis der natürlichen Stoffe wurden sogenannte synthetische Tyrphostine (Tyrosin-Phosphorylierungs-Inhibitoren) entwickelt, die eine höhere Spezifität für einzelne Phosphotyrosinkinasen aufweisen.

Eines der am weitesten entwickeltsten Tyrphostine war CGP57148 (Novartis, Basel, Schweiz), dessen Namen inzwischen in STI 571 geändert wurde.



**Abb. 3:** Strukturformel des ABL Tyrosinkinase-Inhibitors CGP57148 (STI571)

STI571 (STI) ist ein kompetitiver Inhibitor der Abl-Tyrosinkinase, der an der ATP-Bindungsstelle des Proteins bindet. Hierdurch wird die Übertragung von Phosphat auf verschiedene Substrate der ABL- und BCR-ABL-Tyrosinkinase verhindert [Druker et al., 1996, Buchdunger et al., 1996].

Sowohl die Fähigkeit des ABL-Tyrosin-Kinsae-Inhibitors, in vitro die Kinase-Aktivität verschiedener Tyrosinkinasen zu hemmen, als auch die Fähigkeit von STI Kinasen in der Zelle zu hemmen, wurde untersucht. Hierbei wurden nicht nur v-Abl, Bcr-Abl und c-Abl berücksichtigt, sondern auch Wirkungen von STI auf die Transmembranen Rezeptoren EGFR-R-ICD (Epidermal Growth Factor-Receptor), Her2, Insulin-Receptor, IGF1R (Insulin-like Growth Factor-1-Receptor) und PDGF-R (Platelet-

derived Growth Factor Receptor) beobachtet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt:

Protein Kinase	Substrat Phosphorylierung IC50 Wert ( $\mu\text{M}$ )	Zelluläre Tyrosinsphorylierung IC50 Wert ( $\mu\text{M}$ )
v-Abl	0,038	0,25
Bcr-Abl	0,025	0,25
c-Abl	0,025	
EGFR-R-ICD	>100	>100
Her-2/neu		>100
Insulin Receptor		>100
IGF-1R		>100
PDGF-R		0,3

Tab. 2: Wirkung des Abl-Tyrosinkinase Inhibitors STI571 auf verschiedene Rezeptoren und Tyrosinkinasen [nach Druker B et al., 1996]

Es zeigte sich, dass STI ein potenter und selektiver Inhibitor der Abl Kinase ist (IC50 zellulär bei einer Konzentration von 0,25 $\mu\text{M}$ ). Eine unspezifische Wirkung von STI wurde gegenüber PDGF-R festgestellt (IC50 bei 0,3 $\mu\text{M}$ ) [Druker, B., Tamura, T. 1996]. Weiterhin wurden Wirkungen von STI gegenüber dem Stammzellfaktorrezeptor c-kit [Buchdunger E et al., 2000; Heinrich MC et al., 2000] und der dem ABL sehr ähnlichen ARG-Kinase [Okuda K et al., 2001] nachgewiesen. Aufgrund seiner Eigenschaft als potenter Inhibitor der ABL-Kinase ist STI eine interessante Substanz zur Therapie von Leukämien, die das Ph-Chromosom aufweisen. Seine Eigenschaft als Inhibitor von c-kit macht es weiterhin zu einem interessanten Therapeutikum der akuten myeloischen Leukämie [Kindler T et al., 2002] und von soliden Tumoren, deren Proliferation Stamm-Zell-Faktor abhängig ist wie gastrointestinalen stromalen Tumoren [Demetri GD et al., 2002].

## **1.8 Fragestellung**

Der ABL-Tyrosinkinaseinhibitor STI571 ist ein innovativer Signaltransduktionsinhibitor mit antileukämischer Wirksamkeit bei Patienten mit Ph+ ALL und CML. In der vorliegenden Dissertationsschrift untersuche ich, ob STI571 auch zu einer Reduktion von Ph+ ALL Blasten in vitro führt, und ob die Wirkung von STI571 ein selektives Purgung von Tumorzellen zulässt. Hierbei setze ich mich mit folgenden offenen Fragen auseinander:

1. Wie wirkt der ABL-Tyrosinkinase-Inhibitor STI571 auf das Wachstum, die Proliferationsrate und die Apoptose von Zelllinien, die den kleinen (P190) und den großen (p210) Bruchpunkt aufweisen?
2. Welche Wirkung hat STI571 auf Ph+ ALL Blasten im Rahmen eines in vitro purging Versuches insbesondere im Hinblick auf die Reduktion der Blasenzahl verschiedener Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und eines Rezidives?
3. Welchen Einfluss hat STI571 auf Blasten von Patienten mit Ph+ALL im Zustand der kompletten zytologischen Remission und kommt es unter der Wirkung des Kinase-Inhibitors zur Eradikation vereinzelter residueller leukämischer Blasten?
4. Gibt es Zellen, die der Wirkung von STI571 entgehen, und welche Mechanismen kommen hierfür in Frage?
5. Hat STI571 einen Einfluß auf die Proliferation und die Viabilität von normalen hämatopoetischen Progenitorzellen und Stammzellen in vitro?

## 2 Materialien

### 2.1 Allgemeine Laborgeräte und Materialien

Cell Harvester (Inotech)  
Cytospin 2 Zentrifuge (Kühn&Bayer)  
Durchflußzytometer FACScan (Becton Dickinson)  
Feinwaage BP 2 100 S (Sartorius)  
Gefrierschrank Electronic (Bosch)  
Gefriertruhe Colora E80 (Heraeus Instruments)  
Gel-Elektrophorese-Kammern, Kühn&Bayer (Hybaid, Renner)  
Gewebekulturflaschen 1000ml, 250 ml, 50ml steril (Greiner)  
Heizblock Digital Dry Block Heater (PMC)  
Heizblock Thermostat 5320 (Eppendorff Gerätebau)  
Inkubator (Heraeus)  
Kamera (Polaroid)  
Kühl-Tischzentrifuge (157.MP, OLE DICH)  
Kühlzentrifuge Biofüge 13 R (Heraeus Instruments)  
Laminar Flow Bank 2472 GS (Heraeus-Christ)  
Latex Handschuhe Examination Gloves (Annsel)  
Liquid Szintillation Analyser (Packard, Tri-Carb 1500)  
Mikroskop (Zeiss)  
Mikrowellenherd (Bosch)  
Neubauer-Zählkammer (Brand)  
Petrischalen 35mm (Greiner)  
Ph-Meter (CG825, Schott)  
Photometer GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech)  
Pipetten (Gilson)  
Pipetten 2, 5, 10, 25 ml (Becton-Dickinson)  
Pipettenspitzen (Saarstedt)  
Pipettenspitzen, gestopft ART (Molecular Bio-Products)  
Pipettierhilfe Pipet Boy (Technomara)  
Quarzglasküvetten, 10mm Schichtdicke (Kühn&Bayer)

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorff Gerätebau)  
Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorff)  
Reaktionsgefäßständer Micro Test Tube Rack (Brand)  
Röhrchen zur Zentrifugation, 15ml, 50 ml (Greiner)  
Sofortbild-Filme (Polaroid)  
Spannungsgerät PS 9009 TC (GibcoBRL, Life Technologies)  
Spannungsgerät PS EPS 200 (Pharmacia Biotech)  
Spectrometer U-2000 (Hitachi)  
Termocycler Progene (Techne, Termo Dux)  
Thermocycler Typ 480 (Perkin-Elmer)  
Tischzentrifuge 5415C (Eppendorff)  
Ultraschall-Wasserbad Sonorex RK255 (Bandelin, Elektronik KG)  
Ultrazentrifuge MinifugeT (Heraeus Instruments)  
UV-Lampe Transilluminator (Bachhofer)  
UV-Tisch (302nm) (Bachhofer)  
Vacuum Concentrator (Bachhofer)  
Variable Mikroliterpipetten 10µl, 100µl, 1000µl, (Eppendorff)  
Varioklav Dampfstерilisatoren (H+P Labortechnik)  
Vortexer VF2 (Janke & Kunkel IKA Labortechnik)  
Well-Platten (6,8,16,96) (Nunc, Germany)  
Zentrifuge Typ Minifuge T (Heraeus)  
Zentrifuge Typ Universal 30 RF (Hettich)

## **2.2 Zellkultur, 7AAD-Apoptose-Assay, H3-Thymidin-Assay: Medien, Chemikalien und Enzyme**

7 Aminoactinomycin D (7AAD) (Fluka Chemie AG)  
BSA (Rinderserumalbumin) (Gibco BRL)  
Cholesterin (Gibco BRL)  
EPO (Sigma München)  
FCS (Gibco BRL)  
FCS (Hyclone Laboratories)  
Ficoll (Pharmacia Biotech)  
G-CSF (Sigma München)

GM-CSF (Sigma München)  
Geneticin (Gibco BRL)  
Glutamin 200mM (100x) (Gibco BRL)  
Gluthation reduziert (Sigma-Aldrich)  
<sup>3</sup>H-Tymin (Amersham)  
IMDM (Biochrom KG)  
Insulin (Sigma)  
Interleukin 3 (Sandoz)  
Interleukin 6 (Cell Concepts)  
Interleukin 7 (Immunex)  
SCF (Pepro Tech)  
Isopropanol (Riedel de Haen)  
Methylcellulose (Fluka, Switzerland)  
Mercaptoethanol (Sigma, München)  
Natriumacid (Riedel de Haen)  
PBS Dulbecco's (Gibco BRL)  
Penicillin/Streptomycin (10000U/ml) (Gibco BRL)  
Pferdeserum (Cansera, Canada)  
RPMI 1640 (Gibco BRL)  
Trypanblau-Lösung (Bio Whittaker)  
Trypsin (Gibco BRL)  
Türks-Lösung zur Leukozytenzählung (Merck)

### 2.3 Molekularbiologie: Materialien, Geräte, Chemikalien

2-Desoxynukleotidtriphosphate dNTP-Set 100 mM (Pharmacia Biotech)  
Agarose (Gibco BRL)  
Chloroform (Merck)  
DEPC-H<sub>2</sub>O (eigene Herstellung)  
Destilliertes Wasser (eigene Herstellung, Millipor-Anlage)  
Elektrophoreseauftragspuffer Bromphenol-Xylol-Cyanol (eigene Herstellung)  
Ethanol reinst (Apotheke der Johann Wolfgang Goethe Universität)  
Ethidiumbromid Lösung 1% (Roth)  
Isopropanol (Riedel-de-Haen)

Magnesiumchlorid 50 mM (Gibco BRL)  
Mineralöl (Sigma)  
PCR-Puffer 1 Ox (Gibco BRL)  
RNase Inhibitor RNA guard (Pharmacia Biotech)  
DNA-Längenstandard (Gibco BRL)  
Oligo dT 0,5 gg/~il (Gibco BRL)  
RNAzol (Gibco BRL)

*Enzymefür die RT-PCR:*

Taq-Polymerase 5 Uffil (Gibco BRL)  
Reverse Transkriptase Superscript@ 200 U/gI (Gibco BRL)

*Elektrophoresepuffer:*

20 ml 50 x TAE-Lösung in 1000 ml ddH2O

*50 x TAE-Stammlösung:*

2 M Tris 1 00mM EDTA mit Eisessig auf pH 8,0 einsellen

*Elektrophoreseauftragspuffer (Laufpuffer):*

1,25 g Bromphenolblau  
1,25 g Xylol-Cyanol FF  
20 g Saccharose in 100 ml ddH2O

*DNA-Längenstandard.*

10 gl DNA- 1 k13 bzw. 100 BP Ladder  
20 gl 6x Elektrophoreseauftragspuffer in 90 gl ddH2O

*Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H2O:*

1 ml DEPC in 1000ml ddH2O bei 37°C über Nacht rühren lassen und autoklavieren

## 2.4 Zelllinien

In den Versuchen wurden die Zelllinien BV173, SD1, SEM sowie die Fibroblasten Zelllinie NIH 3T3 verwendet.



Die Zelllinie BV173 wurde 1983 von Pegoraro L et al. etabliert und stammt von einem Patienten mit Ph+ akuter lymphatischer Leukämie. Sie weist den grossen Bruchpunkt von BCR-ABL (P210) auf. Phänotypisch weist sie Charakteristiken von Prae-B-Zellen auf [Pegoraro L et al., 1983]

Die Zelllinie SD1 wurde 1991 von Duth S et al. etabliert und stammt wie BV173 von einem Patienten mit Ph+ akuter lymphatischer Leukämie. Sie weist aber den für die Ph+ ALL typischen kleinen Bruchpunkt von BCR-ABL auf [Duth S et al., 1991].

Die Zelllinie SEM wurde 1994 von Greil J et al. etabliert und stammt aus dem peripheren Blut eines 5-jährigen Mädchens mit akuter lymphatischer Leukämie. Die Zelllinie weist keine BCR-ABL-Translokation auf, aber die Zytogenetik zeigte ein chromosomales T(4;11)-Rearrangement [Greil J et al., 1994].

Bei der Zelllinie NIH3T3 handelt es sich um eine murine adhärenz wachsende Fibroblasten-Zelllinie, die 1969 von Jainchill JL et al. etabliert wurde [Jainchill JL et al., 1969]

### 2.5 Primäre Blasten von Patienten mit ALL

Das untersuchte Zellmaterial stammte von Patienten, die sich im Zustand nach Erstdiagnose einer akuten lymphatischen Leukämie, in kompletter Remission oder im Zustand eines aufgetretenen Rezidives befanden. Die verwendeten Zellen waren vor dem Beginn ihrer Kultivierung alle in flüssigen Stickstoff eingefroren und stammten sowohl aus Knochenmarkspunktionen, als auch aus Leukafferatesen. Im Falle von Philadelphia-Chromosom positiven Zellen wurde die Diagnose entsprechend den Kriterien der Deutschen ALL-Studiengruppe (GMALL) [Ludwig WD et al. 1998] gestellt, und bei diesen Patienten eine Translokation (9;22) mittels konventioneller Zytogenetik oder PCR Analyse nachgewiesen. Die molekulargenetische Analyse der BCR-ABL-Translokation wurde in den zentralen Studienlabors in Berlin und Ulm vorgenommen und ergab übereinstimmend bei allen hier aufgeführten Philadelphia-Chromosom positiven Patientenzellen den kleinen (p185), ALL-typischen, Bruchpunkt.

Tabelle 3 gibt einen Überblick der untersuchten Patientenzellen.

Pat. ID	Alter <sup>1</sup>	Ge-schlecht	ALL Subtyp	Quelle der Zellen	Leuko-zyten/nl <sup>1</sup>	Blasten in PB <sup>1</sup> (%)	Blasten im KM/PB <sup>2</sup> (%)	Status der ALL <sup>1</sup>
C.H.	55	F	c-ALL	PB	285.5	91	KM 98%	DX
P.V.	32	M	c-ALL	KM	18.4	80	KM 38%	REL1
P.P.	30	F	c-ALL	PB	22	46		DX
D.R.	57	M	c-ALL	KM	51	82	KM 89%	DX
W.N.	56	M	Prae-B	KM	31.2	81	KM100%	DX
R.G.	43	F		KM	21.9	46	<5%	CR1
U.N.	39	M	c-ALL	KM	3.8	6	<5%	CR1
I.Z.	43	F	Prae-B	PB	51	99		CR1

<sup>1</sup> bei Erstdiagnose

<sup>2</sup> Zum Zeitpunkt der aktuellen Analyse

PB= peripheres Blut

DX= Diagnose

CR1= erste komplette Remission

REL= erstes Rezidiv

Tab. 3: Charakteristika der in den Zellkulturen verwendeten Patientenzellen.

## 3 Methoden

### 3.1 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Beim Führen einer Zellkultur ist es wichtig, die Zellzahl innerhalb einer Zellsuspension bestimmen zu können und gegebenenfalls auf eine bestimmte Zahl pro Volumen einzustellen. Die gebräuchlichste Methode zur Bestimmung der Zellzahl ist die Auszählung von Zellen unter dem Lichtmikroskop in einer sogenannten Neubauer-Zählkammer.

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus 9 großen Quadranten, wobei die äußeren 4 in 16 kleine Quadranten unterteilt sind. Jeder Große Quadrant hat eine Fläche von  $1\text{mm}^2$  und eine Tiefe von  $0,1\text{mm}$ . Hieraus ergibt sich, dass jeder Großquadrant ein Volumen von  $0,1\mu\text{l}$  aufweist. Will man also die Zellkonzentration der Zellen im Medium in der Einheit Zellen/ml errechnen muss man den Faktor  $1 \times 10^4$ , sowie den Verdünnungsfaktor der Zellkultur berücksichtigen.

### 3.2 Durchführung der Zählung:

Vor dem Benutzen der Zählkammer und des Deckglases sollte man selbige mit 70%-igen Ethanol gründlich reinigen. Das Deckglas wird durch anhauchen angefeuchtet und vorsichtig auf die Zählkammer gedrückt bis sogenannte Newtonsche Ringe sichtbar werden. Die mit Trypanblau verdünnte Zellsuspension wird in die Zählkammer pipettiert (ca.  $10\mu\text{l}$ ) und es werden die Zellen innerhalb von 4 Quadranten ausgezählt. Aus der Summe der in den 4 Quadranten gezählte Zellen wird der Mittelwert für einen Quadrant errechnet. Durch Einsetzen des Mittelwertes in folgende Formel wird die Zellzahl/ml Medium bestimmt.

$$Z = \text{Mittelwert} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 3.3 Bestimmung der Zellviabilität durch Trypanblau-Exklusion

Mit Hilfe des Trypanblautestes ist es möglich, zwischen viablen und nicht viablen Zellen unter dem Mikroskop zu unterscheiden. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff und bindet sehr gut an Proteinen. Bei viablen Zellen mit intakter Zellmembran kann

der Farbstoff nicht in das Innere der Zelle gelangen. Tote Zellen hingegen nehmen den Farbstoff auf und färben sich blau an. Die Blaufärbung der toten Zellen lässt sich lichtmikroskopisch gut beobachten und erlaubt eine Unterscheidung zwischen toten und viablen Zellen. Da Trypanblau zelltoxisch ist, muss die Zellzählung unmittelbar nach der Zugabe erfolgen.

### **3.4 Durchführung der Viabilitätsbestimmung:**

50µl Zellsuspension werden mit 50µl einer 0,4% Trypanblaulösung in einem Eppendorfcup gut gemischt und 10µl der entstehenden Suspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Mindestens 100 Zellen werden ausgezählt und auf Blaufärbung überprüft. Auch schwach blau gefärbte Zellen werden als nicht mehr viabel gewertet.

Der Prozentsatz der lebenden Zellen errechnet sich aus folgender Formel:

$$\text{Viabilität in \%} = [\text{ungefärbte Zellen}/(\text{ungefärbte} + \text{gefärbte Zellen})] \times 100$$

### **3.5 Isolation mononukleärer Zellen**

Aufgrund des Dichteunterschiedes der einzelnen Zellpopulationen lassen sich mononukleäre-Zellen als Interphasen-Ring zwischen verdünntem Plasma oberhalb und dem Flotationsmittel (Ficollische Lösung) unterhalb abpipettieren und somit von den restlichen Zellulären Bestandteilen des Blutes (Erythrozyten und Granylozyten) trennen.

In einem 50 ml Röhrchen werden 25 ml Ficollische Lösung mit einem äquivalenten Volumen an peripheren Blut oder Knochenmark überschichtet und bei 1400 UpM 20 Minuten zentrifugiert. Die Interphase wird mit einer Pipette abpipettiert und in ein weiteres 50 ml Röhrchen gegeben. Nach erneuter 5minütige Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das überbleibende Pellet zweimal in PBS gewaschen, um das zelltoxische Ficoll vollständig zu entfernen. Weist das überbleibende Pellet immer noch eine rote Farbe auf, was für eine hohe Erythrozytenverunreinigung spricht, kann der Vorgang wiederholt werden.

Zum Zählen werden die verbleibenden Zellen in PBS aufgenommen und einige Mikroliter in Trypanblau angefärbt und in einer Zählkammer gezählt.

### 3.6 Kultivierung der Zelllinien BV 173, SD1 und SEM

Nach dem Auftauen der Zellen, werden diese gezählt und in das für sie geeignete Nährmedium übertragen. Die Ausgangszellkonzentration sollte im Falle von BV173 und SD1  $1 \times 10^5$  Zellen/ml Medium betragen, bei SEM sollte sie bei  $5 \times 10^5$  Zellen/ml Medium liegen.

Alle verwendeten Zelllinien werden in den unten aufgeführten Medien im Brutschrank bei  $40^{\circ}\text{C}$  und 4%  $\text{CO}_2$  –Luftkonzentration gehalten. Etwa alle 2-4 Tage sollte ein Mediumswechsel stattfinden.

Für 100 ml Medium werden folgende Grundsubstanzen in den aufgeführten Mengenverhältnissen zusammenpipettiert:

Substanz	Menge
RPMI 1640	87ml
FCS (Gibco)	10ml
Glutamin	1ml
Penicillin/Streptomycin	1ml
Mercaptoethanol 1:10	1ml

Tab. 4: Medium für BV 173

Substanz	Menge
RPMI 1640	87ml
FCS (Hyclone)	10ml
Glutamin	1ml
Penicillin/Streptomycin	1ml

Tab. 5: Medium für SD1

Substanz	Menge
IMDM	87ml
FCS (Gibco)	10ml
Glutamin	1ml
Penicillin/Streptomycin	1ml

Tab. 6: Medium für SEM

### 3.7 Kultivierung der Zelllinie NIH3T3

NIH3T3 wurden als Fibroblastenstroma zur Kultivierung primärer BCR-ABL positiver ALL-Blasten verwendet.

Da es sich bei NIH3T3 um eine adhärent wachsende Zelllinie handelt, wird die Expansion in großen 1000ml Zellkulturflaschen durchgeführt. Nach ausreichender Expansion werden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von dem Boden der Kulturflasche abgelöst. Hierbei wird das in der Kulturflasche befindliche Medium abgenommen und danach 3ml Trypsin zugegeben und verteilt. Nach einer ca. 3-minütigen Inkubation im Brutschrank haben sich die Zellen annähernd komplett abgelöst. Nun werden die Zellen wieder in Medium aufgenommen und 3x gewaschen, um das verbleibende Trypsin aus der Kultur zu entfernen.

Das weitere Vorgehen hängt von dem Verwendungszweck von NIH3T3 ab:

Soll eine weitere Expansion der Fibroblasten stattfinden, erfolgt deren weitere Kultivierung in dem geeigneten Medium und großen 1000ml Zellkulturflaschen.

Substanz	Menge
RPMI 1640	86ml
FCS (Gibco)	10ml
Glutamin	1ml
Penicillin/Streptomycin	1ml

Tab. 7: Medium für NIH 3T3

Sollen NIH3T3 als Fibroblastenstroma zur Kultur von primären ALL-Blasten verwendet werden, erfolgt eine Bestrahlung der Zellen durch 25Gy Beta-Strahlen. Durch die Bestrahlung nimmt man den Zellen die Möglichkeit der Proliferation. Da NIH 3T3 lediglich als Stromalayer zur Kultivierung von primären ALL-Blasten dient, ist dies sinnvoll. Man vermeidet so eine Proliferation der Stromazellen über die eingangs gewählte Kulturdichte hinaus. Die Bestrahlung von NIH3T3 erfolgt in suspensierter Form.

Da die letztendliche Kultivierung der primären Knochenmarks- oder Leukafferresatzzellen in 6-Well-Platten vorgenommen wird, überführt man die bestrahlten NIH 3T3-Fibroblasten in die einzelnen Wells von 6-Well-Platten. Hierbei werden  $2,5 \times 10^5$  bestrahlte Stromazellen pro Well eingesetzt um einen homogenen

Zellrasen von optimaler Dicht zu erhalten. Die 6-Well Platten werden eine Nacht im Brutschrank stehen gelassen, damit die Zellen genug Zeit haben, am Boden der jeweiligen Wells zu adhären. Am nächsten Tag wird die Dichte des Stroma-Layers mikroskopisch kontrolliert.

### 3.8 Serumfreie Zellkulturen

Vorteil der serumfreien Zellkultur ist die genauere Definition der Kultivierungsbedingungen durch Zugabe von gut charakterisierten Einzelkomponenten. Hierdurch werden mögliche biologische Effekte durch unbekannte Serumbestandteile verhindert. Serumfreies Medium wurde nach der Methode von McLoed et al. mit verschiedenen Modifikationen hergestellt:

Eine 10% Stammlösung von bovinen Serumalbumin wird hergestellt, indem man 20 g BSA in 50ml Aqua dest. löst und durch Zugabe von 10g Amberlite Ionen-Austauschharz (Typ MB1) entionisiert. Nach 18-stündiger Inkubation bei 4°C wird der Überstand dekantiert, im Verhältnis 1:1 mit Aqua dest. verdünnt, mit Natriumbicarbonat auf pH7,2 eingestellt und steril filtriert. Cholesterol wird bei 50°C in absoluten Ethanol gelöst und mit BSA-Lösung verdünnt, um eine 100xStammlösung zu erhalten. Humaninsulin wird als 100x Stammlösung bei -70°C gelagert. Humanes eisengesättigtes Transferrin wird in einer Konzentration von 70mg/ml bei -70°C gelagert.

Das gebrauchsfertige serumfreie Medium wird durch Addition der entsprechenden Aliquots zu IMDM nach folgender Tabelle hergestellt:

Substanz	Menge
IMDM	84ml
10% BSA	10ml
Glutamin (Gibco)	1ml
Penicillin/Streptomycin	1ml
Insulin	1ml
Mercaptoethanol 1: 10	1ml
Transferrin	1ml
Cholesterol	1ml
Natrium-Selenit	1µl

Tab. 8: Serumfreies Medium

### 3.9 Kultivierung primärer ALL-Blasten

Die Kultivierung der primären ALL-Blasten erfolgt in serumfreiem Medium (Medium ohne FCS) auf einem Fibroblastenstroma [Whitlock CA et al., 1987; Palacios R et al., 1989] unter der Zugabe der Interleukine IL3 und IL7. Der supportive Effekt der Interleukine 3 und 7 [Namen AE et al., 1988; Suda T et al., 1989; Widmer MB et al., 1990] sowie des Fibroblastenstromas [Takeda S et al., 1989; Nishikawa S et al., 1988; Strasser A et al., 1989] sind unverzichtbar, um die Proliferation von primären ALL-Blasten zu stimulieren.

Die Zellen werden nach dem Auftauen 2x gewaschen, gezählt und unmittelbar in serumfreies Medium überführt, wobei die anfängliche Zellkonzentration  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Medium beträgt. Das Medium mit den darin befindlichen primären ALL-Blasten wird in 6-Well-Platten überführt, auf deren Boden sich das NIH3T3-Fibroblastenstroma befindet. Hierbei werden  $1 \times 10^6$  Zellen/Well eingesetzt.

Die Zellen werden bei 40°C und 4% CO<sub>2</sub> kultiviert.



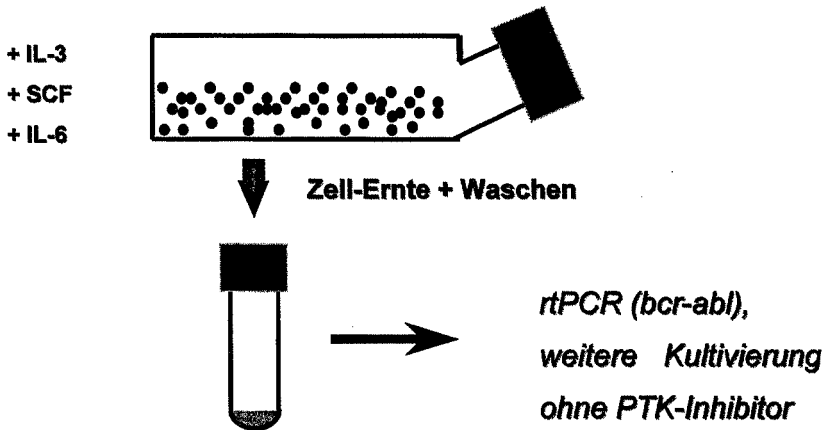
### **3.10 In vitro Purging und Effekte von STI571 auf frühe leukämische Progenitorzellen**

Um festzustellen, ob STI571 auch in einer Purging-Situation bei einer autologen Stammzelltransplantation zur Reduktion der Ph+ ALL-Blasten führt, wurde ein zweistufiges Kultursystem für Knochenmarks- und periphere Blutzellen von Patienten mit Ph+ ALL entwickelt.

In einer primären Kultivierungsperiode wurden Ph+ ALL-Blasten in serumfreiem Medium ohne Stroma und +/- 5µM STI571 kultiviert. Zusätzlich enthielt das verwendete Medium IL3, IL6 und Stammzellfaktor. Am Tag 6 wurden Zellen zur RT-PCR und für CFUs und LTCICs entnommen. Die primäre Kultivierungsphase ist durch das Fehlen eines Stromalen Supports und IL7 suboptimal für das Wachstum von leukämischen Progenitor-Zellen, aber geeignet für die Expansion von normalen hämatopoetischen Progenitorzellen [Eder M et al., 1992].

In einer sekundären Kultivierungsphase wurden die Zellen in serumfreiem Medium auf NIH3T3 Stroma und ohne STI571 kultiviert. Zusätzlich enthielt das verwendete Medium IL3 und IL7. In dieser Kultivierungsphase wurden sukzessive alle 6 Tage Zellen zur RT-PCR geerntet. Die sekundäre Kultivierungsphase weist durch das CD40L-transfizierte Fibroblastenstroma und die Zugabe der Interleukine IL3 und IL7 optimierte Bedingungen für die Expansion von leukämischen Progenitorzellen auf. Abbildung 4 zeigt eine schematische Illustration der Zellkulturabläufe.

## Primärkultur +/- 5µM Kinase-Inhibitor STI571



## Sekundärkultur ohne STI571 (2-3 W.)

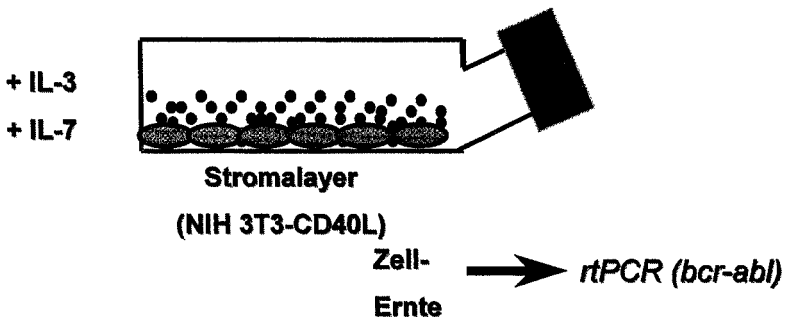


Abb. 4: Schematische Darstellung der Kultivierungsbedingungen während des *in vitro* Purgings-Versuches. Die Bedingungen der primären Kultivierungsphase +/- 5µM STI und der sekundären Kultivierungsphase ohne den Kinase-Inhibitor sowie die an den verschiedenen Zellkulturen vorgenommenen Untersuchungen sind dargestellt.

### 3.11 Klonogene Assays für hämatopoetische Stammzellen

Kolonie-bildende Assays (Colony Forming Units [CFU]) zum Nachweis von myelomonozytären (CFU-GM) multipotenten (CFU-GEMM) sowie erythropoetischen (BFU-E und CFU-E) Vorläuferzellen werden in semisoliden 1ml Kulturen in 35mm Schalen durchgeführt, bestehend aus 1,2% Methylzellulose in IMDM mit 30% FCS,  $5 \times 10^{-5}$ M 2-Mercaptoethanol und  $10^{-6}$ M eisengesättigten humanen Transferrin. In Abhängigkeit vom Reinheitsgrad der Zellpopulation werden  $500-5 \times 10^5$  Zellen/ml kultiviert. Stimuliert werden die Kulturen mit IL3 (10ng/ml), GM-CSF(10ng/ml), G-CSF(20ng/ml) und EPO (2U/ml). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines inversen Mikroskopes nach 14-tägiger Inkubation bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> in Raumluft in H<sub>2</sub>O gesättigter Atmosphäre. Multizentrische oder sehr große unizentrische (>500Zellen) erythroide Kolonien werden als BFU-E gezählt. CFU-GM mit myelisch und monozytär differenzierenden Zellen werden ab einer Größe von 50 Zellen als Kolonie, bei <50 Zellen als Cluster gewertet. Die Klonierungskapazität wird errechnet als Prozentsatz der Menge an CFU-GM dividiert durch die Zahl der in 1ml eingesetzten viablen Zellen.

### 3.12 Long-Term Culture-Initiating Cell Assays (LTCIC)

Die Knochenmarksfibroblastenzelllinie FBMD-1 wird nach Bestrahlung mit 80Gy Betastrahlen in 96-Loch-Platten ausplattiert, so dass sich homogene Stroma-Layers bilden. Die Menge der zu kultivierenden Ph+ ALL-Blasten wird nach 6-tägiger Kultur +/- 5µM STI (wie oben beschrieben) individuell bestimmt. Die Zellen werden in 200µl Langzeitmedium aufgenommen und auf den Stroma-Layern der 96-Loch-Platte ausplattiert (ca.50000-100000 je Loch). Die Platten werden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C für 5 Wochen kultiviert. Wöchentlich wird die Hälfte des Kulturmediums ausgetauscht. Nach 5 Wochen werden die Zellen geerntet und 50000-100000 Zellen in 1ml semisoliden CFU-Medium aufgenommen. Nach 12-14 Kultivierungstagen wird die Zahl der CFU-GM bestimmt und die Klonierungskapazität wie oben beschrieben errechnet.

Substanz	Menge
IMDM	75ml
FCS	12,5ml
Pferdeserum	12,5
Glutamin	1ml
Penicillin/Streptomycin	1ml
IL3	10ng/ml
G-CSF	10ng/ml

Tab. 9: Langzeitmedium

### 3.13 3H Thymidin-Proliferationsassay

Alle Zellen vermehren sich nach einem immer wieder ablaufenden Zyklus, der in einzelne Phasen unterteilt ist. Hierbei unterscheidet man:

**G0-Phase:** Beliebig lang dauernde Ruhephase ohne Teilungsaktivität.

**G1-Phase:** Verstärkte RNS-Synthese, Proteinsynthese, Synthese der für die Replikation wichtigen Enzyme.

**S-Phase:** Semikonservative DNA-Reduplikation.

**G2-Phase:** Reparatur von DNA-Schäden, Vorbereitung der Mitose.

**Mitose:** Zellteilung (Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase)

Um Aufschluss über die proliferative Aktivität innerhalb einer Zellkultur zu gewinnen, wird den einzelnen Kulturen für einen Zeitraum von 4 Stunden die Nukleobase Thymidin, die zuvor mit dem Wasserstoffisotop  $^3\text{H}$  markiert worden ist, zugegeben. Das radioaktiv markierte Thymidin wird von den Zellen, die während der Pulszeit die S-Phase durchlaufen, in die DNA integriert. Nach Ablauf des vierstündigen Pulses werden die Zellen gewaschen und ihre Radioaktivität bestimmt. Je höher hierbei die gemessene Radioaktivität einer Zellkultur ist, desto stärker war ihre proliferative Aktivität während des vierstündigen Pulses. Im einzelnen läuft der Versuch folgendermaßen ab:

Den Zellkulturen werden ca  $1 \times 10^5$  Zellen entnommen. Den entnommenen Zellen wird 1/100 des Volumens an  $H^3$ -Thymidin zugegeben. Anschließend werden die Zellen auf jeweils 4 Wells einer 96-Loch-Platte verteilt. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank werden Die Zellen mit der Erntemaschine geerntet und deren Radioaktivität gemessen. Die Einheit der erhaltenen Werte ist Counts per minute [cpm].

### 3.14 Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACScan) ist es möglich einzelne Zellen nach 5 verschiedene Parameter zu beurteilen. Man kann die Zellgröße und die Granularität der Zellen messen sowie drei Fluoreszenzwellenspektren durch Beschuss der Zellen mit einem Argonlaser (488nm Wellenlänge) beurteilen. Im Durchflußzytometer werden die Zellen einzeln durch eine Quarzküvette geleitet. Dort werden sie mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488nm beschossen. Die durch die Zellen verursachte Streuung des Laserlichtes und die durch angeregte Fluorochrome entstehende Fluoreszenz werden von Lichtdetektoren gemessen

Sogenannte Fluorochrome haben die Eigenschaft nach Absorption von energiereicher Strahlung (hier der Argon-Laserstrahlen) mit Lichtemission zu reagieren. Diese Eigenschaft nennt sich Fluoreszenz. Durch die energiereiche Strahlung des Argon-Lasers werden die Elektronen des Fluorochroms von einer niedrigeren Elektronenschale auf eine höhere Elektronenschale gehoben. Bei Rückfall der Elektronen auf die niedrigere Schale wird sowohl Energie in Form von Wärme als auch in Form von Licht frei. Das hierbei emittierte Licht weist eine größere Wellenlänge auf als das Licht des Lasers. Das gebildete Licht (Emissionsspektrum) ist also stets langwelliger und somit energieärmer als das Anregungslicht.

Die Erscheinung der Fluoreszenz macht man sich bei der Durchflusszytometrie zu nutze. Die hierbei verwendeten Fluorochrome Fluoreszeinisothiozyanat (FITC), R-Phycoerxthin (PE) und 7-Aminoactinomycin D (7AAD) lassen sich bei 488nm durch einen Argonlaser anregen, haben aber unterschiedliche Emissionsspektren.

Die Fluoreszenz der markierten Zellen lässt sich im FACScan mit Hilfe von Breitbandfiltern messen und grafisch darstellen. Hierbei wird die grüne FITC-Fluoreszenz über einen 530nm Filter (Detektor FL-1), die orange PE-Fluoreszenz

über einen 585nm-Filter (Detektor FL-2) und die rote 7AAD-Fluoreszenz mit Hilfe eines 650nm Filters (Detector FL-3) gemessen. Da aber eine Überlappung der einzelnen Emissionsspektren besteht, wird bei gleichzeitiger Messung zweier Fluoreszenzspektren eine Kompensation notwendig.

In der Praxis macht man sich die Fluorochrome FITC, PE und 7AAD besonders zur Unterscheidung von Zellen hinsichtlich ihrer Antigene zunutze. Es existieren Antikörper gegen zelluläre Antigene, die mit einem dieser Fluorochrome markiert sind. Mit Hilfe der FACS-Technologie ist es somit möglich, Aufschlüsse über Expressionsmuster verschiedener zellulärer Antigene einer Zellpopulation zu erhalten. Weiterhin ist es möglich mit Hilfe von Fluorochromen, die in Nukleinsäuren interkalieren, (z.B. Propidiumjodid) den DNA-Gehalt von Zellen zu ermitteln. Andere Fluorochrome dringen nur in tote oder apoptotische Zellen ein und können daher zur Bestimmung der Rate an toten und apoptotischen Zellen innerhalb einer Zellsuspension genutzt werden (7AAD)

In wie weit das Licht des Argonlasers beim Durchdringen einer Zelle gestreut wird, hängt sowohl von der Schichtdicke und der Größe der Zelle als auch von ihren zytosolischen Eigenschaften, wie zum Beispiel der Anwesenheit von Granula oder der Größe des Zellkerns, ab. Streuungseffekte können beim Durchdringen der Zelle grundsätzlich in alle Richtungen auftreten. Am größten ist der Streuungseffekt aber im kleinwinkeligen Bereich ( $3-10^\circ$ ) des Lichteinfalls. Diese Art der Lichtstreuung wird auch Vorwärtsstreulicht genannt und wird vom FACScan unter dem Parameter FSC gemessen. Da die Vorwärtsstreuung hauptsächlich von der Größe der Zelle abhängt, gilt FSC als Maß für die Größe der Zelle. Eine Seitwärtsstreuung des Lichtes tritt bei lymphatischen Blasten im geringeren Maße auf als der Vorwärtsstreuungseffekt. Seitwärtsstreulicht (SSC) ist abhängig von der Zellgranularität und wird als Maß für selbige herangezogen.

Die Darstellung der gemessenen Parameter kann eindimensional, zweidimensional oder dreidimensional erfolgen. Im Falle der eindimensionalen Darstellungsform erhält man die grafische Darstellung der Intensität von einem der Meßparameter in einem sogenannten Histogramm. Die zweidimensionale Darstellung ermöglicht die Visualisierung von zwei Meßparametern gleichzeitig in einem Koordinatenkreuz. Das Ergebnis dieser Darstellungsform nennt sich Dot-Plot.

### 3.15 7-Aminoactinomycin D (7AAD) –Apoptose-Assay

Mit Hilfe von 7-Aminoactinomycin D ist es möglich, zwischen frühen apoptotischen toten Zellen und viablen Zellen zu unterscheiden. Durch den Verlust der Membranintegrität bei apoptotischen Zellen kommt es zu einem Einstrom von 7-Aminoactinomycin D in das Zytoplasma. 7AAD interkaliert hierauf die DNA des Zellkerns und führt zu einer rotlichtfluoreszenz im FACScan.

Methodisch ist die Durchführung des Versuchs unaufwendig: Aus der zu Untersuchenden Zellkultur werden 200 000 Zellen entnommen, abzentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl 7AAD gut resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation im Kühlschrank werden die Zellen im FACScan im Fluoreszenzbereich 3 (650-750nm Wellenlänge) gemessen. Die Auftragung von FL3 erfolgte gegen FSC.

### 3.16 Reverse Transskription und Polymerasekettenreaktion

#### 3.16.1 Grundlagen

Mit Hilfe der RT-Polymerase Chain Reaction [PCR] lassen sich spezifische m-RNA-Fragmente in vitro in DNA umschreiben, enzymatisch expotentiell amplifizieren und nachweisen. Da die PCR von einer DNA-Matritze (template) ausgeht, muss die m-RNA der Zelle zuerst in DNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mit dem retroviralen Enzym *Reverse Transkriptase* (RT-Schritt der RT-PCR). In einer der PCR vorgeschalteten Reaktion wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase die m-RNA in c-DNA überschrieben. Als unspezifische Primer dienen hierbei Oligodesoxythymidylat (Oligo-dt; komplementär zum Poly-A-Schwanz der m-RNA).

Für die PCR selbst verwendet man spezifische Primer, die jeweils die komplementäre Sequenz des 3'-Endes Richtung 5'-Ende der c-DNA-Matritze bzw. ihres Gegenstrangs aufweisen und aus mindestens 15 Basen bestehen. Sie schließen das zu amplifizierende c-DNA-Fragment ein. Katalytisches Element der PCR ist ein Enzym vom Typ DNA-abhängige DNA-Polymerase, hier die aus dem Bacterium *Thermophilus aquatius* stammende Taq-Polymerase. Aus den 4 Phospholipiden Adenosin-, Cytosin-, Guanin- und Thymidintriphosphat, die in den sogenannten d-NTPs enthalten sind und der Reaktion zugegeben werden, setzt die Taq-Polymerase einen komplementären gegenläufigen Antisensestrang zusammen. Die PCR findet in gepufferten Medium statt, das mit Mg<sup>2+</sup> Ionen versetzt ist. Diese

führen unter einer Bildung eines löslichen d-NTP-Komplexes zur beschleunigten Polymerisation und zu einer Stabilisierung des DNA-Doppelhelix.

Grundlage der eigentlichen PCR ist eine zyklische Wiederholung dreier temperaturabhängiger Reaktionsschritte, die sich aus dem thermischen Verhalten der Reagenzien ergeben:

1. Schmelzen des DNA-Doppelhelix bei mindestens 94°C (die DNA wird in komplementäre Einzelstränge zerlegt (*Denaturierung*))
2. Anlagerung der Primer an die Matrize (*Annealing*). Die Annealing Temperatur sollte möglichst hoch sein, da sich nur so Primer und Matrize exakt paaren.
3. Verlängerung der Kopie (*Elongation*). Die Taq-Polymerase setzt am 3'-Ende des Primers an und baut freie Nukleotide komplementär zur Matrize ein. Optimale Aktivität erreicht die Taq-Polymerase bei 72°C.

Dieser Zyklus wird 20 bis 40 mal wiederholt. So erreicht man eine expotentielle Vermehrung der DNA-Fragmente auf mehr als  $1 \times 10^6$  (ausgehend von einem einzigen Matrizenstrang). [Saiki RK et al., 1985; Mullis K et al., 1986; Mullis K et al., 1987; Saiki RK et al., 1988a; Saiki RK et al., 1988b; Chien A et al., 1976]

### 3.16.2 RNA-Isolation mit RNAzol

$1 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^6$  Zellen werden in kaltem PBS gewaschen und in RNAzol aufgenommen (200µl RNAzol / 1000 000 Zellen). Den Proben werden nach langem Vortexen 1/10 des RNAzol Volumen an Chloroform (Chloroform/Isoamylalkohol, 24 : 1) hinzugegeben. Nach abermaligen langen Vortexen werden die Proben bei 14 000 U/min für 15 Minuten kalt (4°C) zentrifugiert. Hierauf wird aus allen Reaktionsgefäßen so viel wie möglich von der oberen wässrigen Phase abgenommen [Chomczynski P, 1993; Chomczynski P et al., 1987].



### 3.16.3 RNA-Fällung

Den einzelnen Proben wird 1µl Glycogen als Fällhilfe und eine der wässrigen Phase gleichwertige Menge Isopropanol zugegeben. Hierauf inkubieren die Proben über Nacht bei -20°C.

Am nächsten Tag werden die Proben 20 min bei 14 000 U/min kalt (4°C) zentrifugiert.

Nach Abnahme des Überstandes werden die entstandenen Pellets in 70% Ethanol (-20°C) gewaschen und ca 2-3min bei 14 000 U/min (4°C) abzentrifugiert. Das Ethanol wird abgenommen und die Pellets für etwa 10 min an der Luft trocknen gelassen. Hierauf werden die Pellets wieder in 30µl depc-H<sub>2</sub>O gelöst und bei -70°C eingefroren.

### 3.16.4 c-DNA-Synthese (reverse Transskription)

5µl RNA werden mit 5µl depc-H<sub>2</sub>O verdünnt und 1µl d(N)<sub>6</sub> Hexamere hinzugefügt. Die Proben werden nun für 5 Minuten in einen 70°C warmen Hitzeblockgestellt, anschließend kurz abzentrifugiert und auf Eis gestellt.

Den Proben wird anschließend 8µl Mastermix inklusive 1µl RNAsin [Blackburn P et al., 1979; Scheele G et al., 1979; de Martynoff G et al., 1980; Eichler DC et al.; 1981] und 1µl Superscript (reverse Transcriptase) zugegeben. Hierauf werden sie für 1h in einen 42°C-Hitzeblock gestellt. Nach Ablauf der Stunde werden die Proben 10 Minuten in den 70°C-Hitzeblock gestellt. Darauf wird den Proben jeweils 30µl depc-H<sub>2</sub>O zugegeben und selbige bei -20°C eingefroren. [Kotewicz ML et al., 1985; Gerad GF et al., 1986, Houts GE et al. 1979 ; ].

Substanz	Menge
First strand Puffer	4µl
dNTP (10µM)	1µl
DTT	2µl
RNAsin	1µ

Tab. 10: Mastermix für C-DNA-Synthese

### 3.16.5 $\beta$ -Aktin-PCR

$\beta$ -Aktin ist ein Housekeeping Gen, das in jeder Körperzelle vorkommt und nach reverser Transkription in vielen Kopien vorliegt. Aus diesem Grund eignet es sich gut als Kontrollsubstrat der erhaltenen c-DNA Menge. Vor allen durchgeführten PCR-Untersuchungen wurde aus diesem Grund eine  $\beta$ -Aktin-PCR durchgeführt.

Die zur Amplifikation von  $\beta$ -Aktin gewählten Primer weisen folgende Basensequenzen auf:

5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3'

3'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-5'

Substanz	Menge
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5 $\mu$ l
PCR-Puffer (10X)	5 $\mu$ l
DNTP (10mM)	1 $\mu$ l
sense Aktin Primer (20pmol)	1 $\mu$ l
antisense Aktin Primer (20pmol)	1 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	0,3 $\mu$ l
Aqua bidest.	35,5 $\mu$ l
c-DNA	5 $\mu$ l

Tab. 11: Mastermix für  $\beta$ -Aktin-PCR

Die Proben werden darauf in die PCR-Maschine gestellt und nach folgendem Programm amplifiziert. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt.

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur
Vorwärmphase	30 sek	40 °C
Initiale Denaturierung	3 min	94 °C
Zyklen	30 sek	94 °C
	45 sek	60 °C
	30 sek	72 °C
Endpolymerisierung	4 min	72 °C

Tab. 12: Programm für  $\beta$ -Aktin-PCR

### 3.16.6 BCR-ABL-PCR

Die BCR-ABL-PCR wurde gegen  $\beta$ -Aktin normalisiert.

Die für die PCR gewählten Primer wurden von Maurer et al. 1991 beschrieben [Maurer et al., 1991] und wiesen folgende Basensequenz auf:

3'-A GAA CGC CTG CGG GTG ATC CAA-5'

5'-CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT TCC-3'

Substanz	Menge
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5µl
PCR-Puffer (10X)	5µl
DNTP (10mM)	1µl
sense BCR-ABL Primer (20pmol)	1µl
antisense BCR-ABL Primer (20pmol)	1µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5µl
Aqua bidest.	35,5µl
c-DNA	5µl

Tab. 13: Mastermix für BCR-ABL-PCR

Dem Mastermix wird 5µl c-DNA hinzugegeben und die Proben hierauf in die PCR-Maschine gestellt und nach folgenden Programm amplifiziert. Die Zyklenzahl betrug 35.

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur
Vorwärmphase	30 sek	40 °C
Initiale Denaturierung	3 min	94 °C
Zyklen	30 sek	94 °C
	45 sek	60 °C
	30 sek	72 °C
Endpolymerisierung	4 min	72 °C

Tab. 14: Programm für BCR-ABL-PCR

### 3.17 „Nested“ PCR

Die sogenannte „nested“ PCR ist eine Methode zur Identifizierung von c-DNA-Fragmenten, die in so geringer Anzahl vorliegen, daß sie mit Hilfe einer herkömmlichen PCR nicht nachgewiesen werden können. Bei der „nested“ PCR schließt man der herkömmliche PCR eine weitere Polymerisierungsreaktion an, deren Matrize das Produkt der herkömmlichen PCR ist. Hierbei verwendet man im Gegensatz zu der vorher durchgeführten herkömmlichen PCR aber Primer, die weiter proximal an der Matrize binden. Das aus der Polymerisierung entstehende DNA-Fragment ist in diesem Fall kürzer als das aus der herkömmlichen PCR entstehende DNA-Fragment.

Folgende Primer werden bei der „nested“ PCR verwendet:

3'-CG GGA GCG GTA GCA ACC CGG TCT AGA-5'

5'-TGT GAT TAT AGC CTA AGA CCC GGA GCT TTT C-3'

Bei der „nested“ PCR auf BCR-ABL wird folgender Mastermix hergestellt:

Substanz	Menge
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5µl
PCR-Puffer (10X)	5µl
DNTP (10mM)	1µl
sense BCR-ABL „nested“ Primer (20pmol)	1µl
antisense BCR-ABL „nested“ Primer (20pmol)	1µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5µl
Aqua bidest.	38,5ml
c-DNA	2µl

Tab. 15: Mastermix für „nested“ BCR-ABL-PCR

Die Proben werden in die PCR-Maschine gestellt und folgende Temperaturen für die Polymerisierungsreaktion verwendet. Die Zyklenzahl betrug hier 25.

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur
Vorwärmphase	30 sek	40 °C
Initiale Denaturierung	3 min	94 °C
Zyklen	30 sek	94 °C
	45 sek	60 °C
	30 sek	72 °C
Endpolymerisierung	4 min	72 °C

Tab. 16: Programm für „nested“ BCR-ABL-PCR

### 3.18 Elektrophorese im Agarosegel

Die Auftrennung und Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels einer Agarose-Gel-Elektrophorese. Hierbei wandert die anionische DNA in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Laufgeschwindigkeit der Fragmente richtet sich hierbei nach der Größe und der elektrischen Ladung. Je kleiner das DNA-Fragment und je größer dessen Ladung, desto schneller bewegt es sich in dem elektrischen Feld

durch das Agarosegel. So kommt eine scharfe Auftrennung des PCR-Produktes in Banden zustande.

Bei der Herstellung eines 1,5% Agarosegels wird 2,25g Agarose abgewogen, in 150ml TAE-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle aufgeköcht. Hierauf lässt man das Agarosegel abkühlen und gibt im Anschluß 1,5µl Ethidiumbromidlösung hinzu. Schließlich wird es blasenfrei in einen Gelschlitten gegossen. Zur Bildung von Gel-Taschen wird ein Kamm eingesetzt. Da die zugesetzte Ethidiumbromidlösung mit den DNA-Fragmenten interkaliert, werden diese im UV-Licht sichtbar. Nachdem das Gel ausreichend gehärtet ist, wird es in die Elektrophoresekammer eingetaucht und anschließend der Kamm entfernt. Durch die Zugabe von sechsfach verdünnten Laufpuffer, der die DNA ummantelt, erfolgt nach dem Pipetieren der DNA ein Absinken auf den Grund der Geltaschen. Darüber hinaus ermöglicht der Laufpuffer die Beobachtung der DNA-Bewegung im Gel. Die Größe der Fragmente wird durch einen zugegebenen DNA-Längenstandard ermöglicht, der aus DNA-Fragmenten definierter Längen besteht. Die Kammer wird unter eine Spannung von 110V gesetzt, wobei die Laufdauer ca. 45 min. beträgt. Von dem resultierenden Agarosegel wird mittels einer Polaroidkamera ein Foto im UV-Licht gemacht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Biologische Effekte des ABL Kinase-Inhibitors STI571 auf die Zelllinien BV173 und SEM

Es werden Ergebnisse aus Versuchen mit der Ph<sup>+</sup> Zelllinie BV 173 (major BCR-ABL) und der Zelllinie SEM dargestellt, die keine BCR-ABL-Translokation aufweist. Es wurden 2 verschiedene Konzentrationen von STI im Kulturmedium (1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) untersucht.

#### 4.1.1 Wachstum der Zelllinien BV173 und SEM in Kultur mit STI571

Die Zellkultur von BV173 zeigt unter dem Einfluss von 1  $\mu$ M STI eine deutliche Wachstumsinhibition. Die Anhebung der Inhibitorkonzentration auf 10  $\mu$ M führt zu keiner weiteren Wachstumsinhibition. In beiden Kulturen sind nach 7 Kultivierungstagen noch  $5 \times 10^4$ – $1 \times 10^5$  viable Zellen nachweisbar. Eine komplette Eradikation von BV173 unter der Wirkung des Kinase-Inhibitors ist nicht zu beobachten (Abb. 5).

Auf das Wachstum der Zelllinie SEM, die aus einer BCR-ABL-negativen akuten lymphatischen Leukämie stammt, hat STI keine inhibierende Wirkung (Abb. 5).

#### 4.1.2 Ergebnisse der 3H-Thymidin-Inkorporationsversuche

3H-Thymidin-Inkorporationsversuche wurden durchgeführt, um Aufschlüsse über die Proliferationsrate von Zellkulturen unter der Wirkung des ABL-Tyrosinkinaseinhibitors STI571 zu erhalten. Die Ergebnisse der Inkorporationsversuche belegen eine starke Reduktion der 3H-Thymidininkorporation bei BV173 unter der Wirkung von 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M STI im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese Beobachtung belegt eine deutliche Minderung der Proliferationsrate unter der Wirkung von STI. Die BCR-ABL-negative Zelllinie SEM hingegen zeigt in Kultur mit 1  $\mu$ M STI keine signifikante Minderung der Proliferationsrate. Allerdings kommt es unter Wirkung von 10  $\mu$ M STI zu einer merklichen Abnahme der Proliferation von SEM. Diese Erscheinung weist auf eine unspezifische, proliferationsmindernde Wirkung des Kinase-Inhibitors STI bei höheren Konzentrationen hin (Abb. 6).

#### **4.1.3 Ergebnisse der 7AAD-Apoptose-Assays**

Der Einfluss von STI auf die Apoptose von Ph+ und Ph- Zelllinien wurde mittels eines 7AAD-Apoptose-Assays untersucht. Die Ergebnisse der Versuche zeigen unter der Wirkung von STI einen deutlichen Anstieg der apoptotischen Zellpopulation innerhalb der Kultur von BV173 im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Zelllinie SEM hingegen zeigt keine Zunahme von apoptotischen Zellen unter dem Einfluß von STI (Abb. 7).



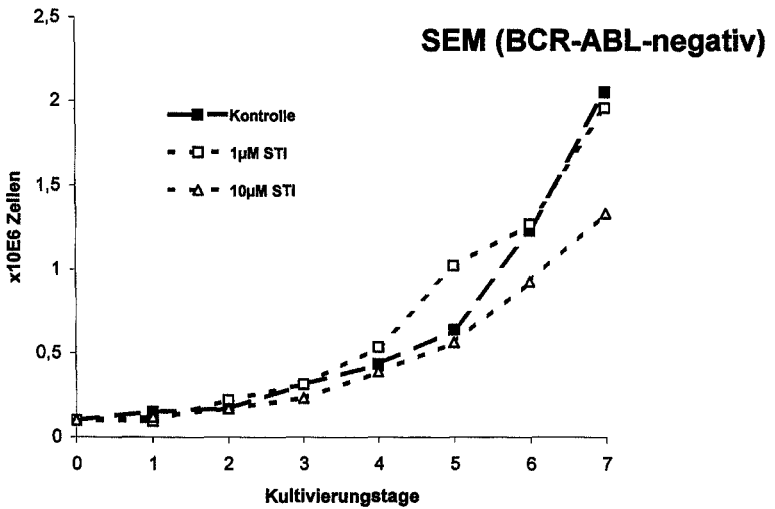
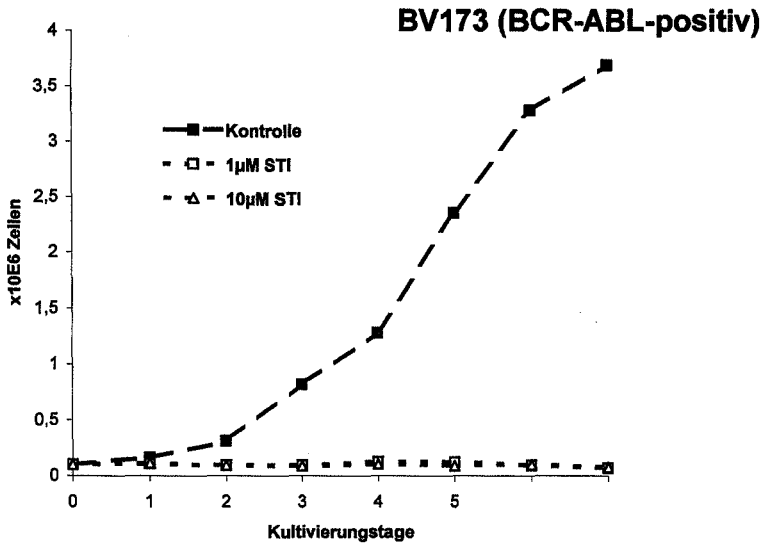


Abb. 5: Einfluss von 1+10µM STI auf das Wachstum der Zelllinien BV173 (BCR-ABL-positiv) und SEM (BCR-ABL-negativ). Unter der Wirkung von STI ist eine deutliche Wachstumsinhibition von BV173 zu erkennen. Auf das Wachstum von SEM nimmt STI keinen Einfluss.

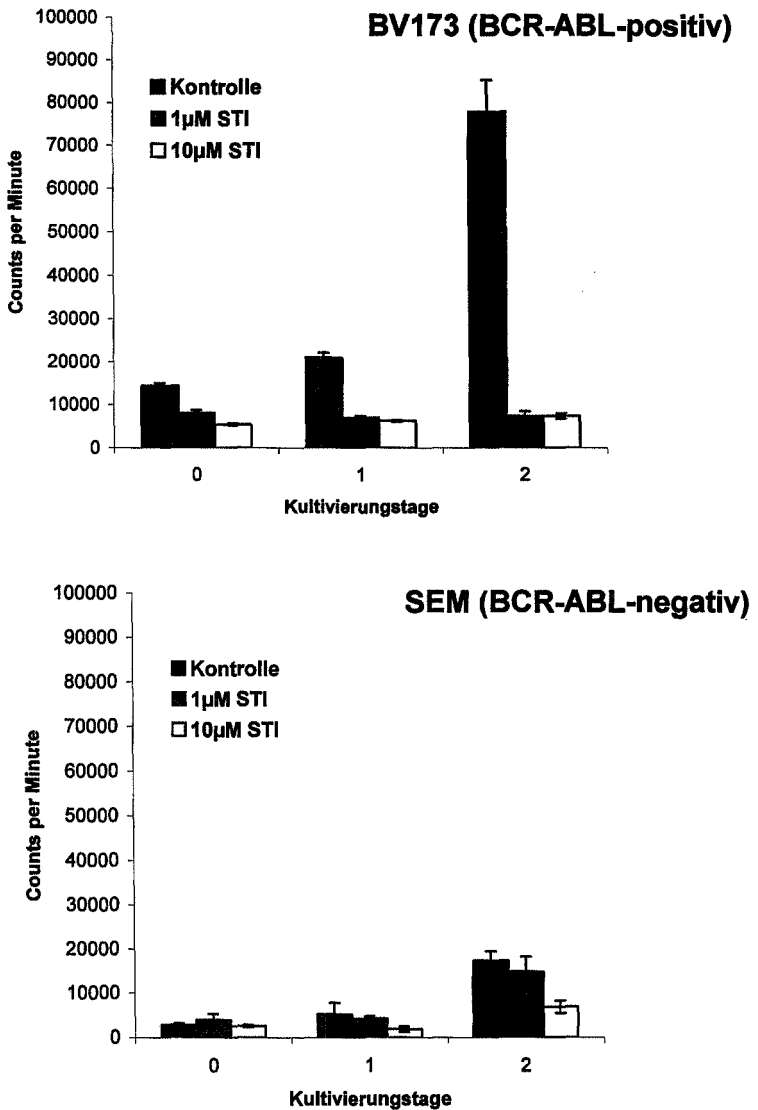


Abb. 6:  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation der Zelllinien BV173 (BCR-ABL-positiv) und SEM (BCR-ABL-negativ) unter dem Einfluß des Kinase Inhibitors STI571. Unter Einfluss von STI kommt es zu einer Minderung der Proliferation von BV173. SEM zeigt in Kultur mit 10µM STI keine Änderung des Proliferationsverhaltens, in Kultur mit 10µM STI hingegen kommt es zu einer diskreten Minderung der Proliferation.

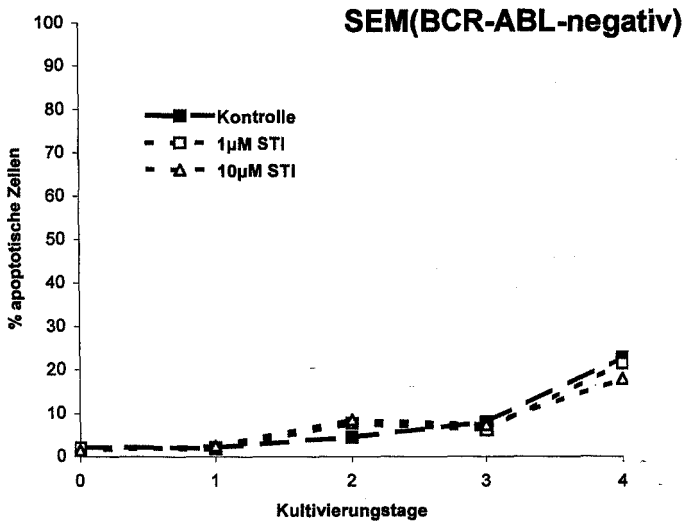
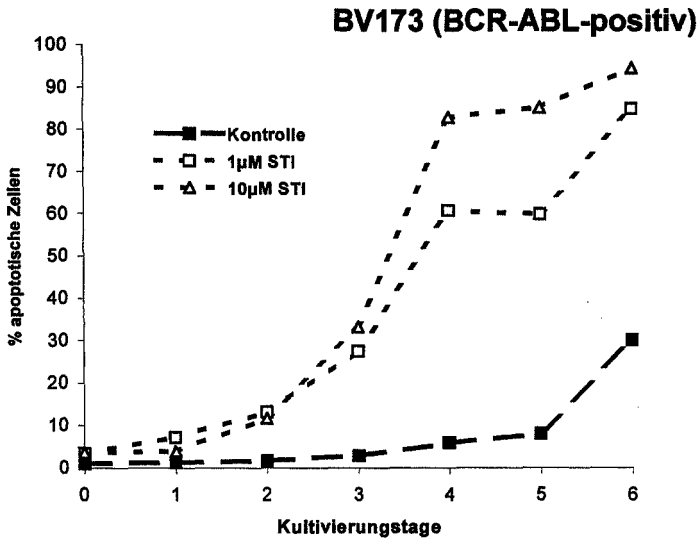


Abb. 7: 7AAD-Apoptose-Assay der Zelllinien SEM und BV173. Im Falle von BV173 zeigt sich ein starker Anstieg der apoptotischen Zellpopulation unter Wirkung von 1 µM und 10 µM STI571. Die BCR-ABL negative Zelllinie SEM hingegen zeigt keine Zunahme der apoptotischen Zellpopulation.

## 4.2 Wirkung des Kinase-Inhibitors STI571 auf die Zelllinie SD1

Im Gegensatz zu BV173 stammt SD1 aus einer akuten lymphatischen Leukämie, die den kleinen Bruchpunkt von BCR-ABL aufweist.

In Kultur mit dem Kinase-Inhibitor zeigt SD1 eine höhere Toleranz gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung von STI. Unter dem Einfluß von  $1\mu\text{M}$  STI kommt es zwar zu einer deutlichen Verlangsamung des Wachstums von SD1; eine komplette Inhibition ist im Gegensatz zu BV173 aber nicht zu beobachten. Eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration auf  $10\mu\text{M}$  führt zu einer weiteren Verlangsamung des Wachstums von SD1. Eine komplette Inhibition ist aber auch hier nicht zu beobachten.

Insgesamt ist die Wirkung von STI571 auf die m-BCR-ABL Zelllinie SD1 deutlich abgeschwächt und im Vergleich zur M-BCR-ABL Zelllinie BV173 stärker von der eingesetzten Inhibitor-Konzentration abhängig (Abb. 8)

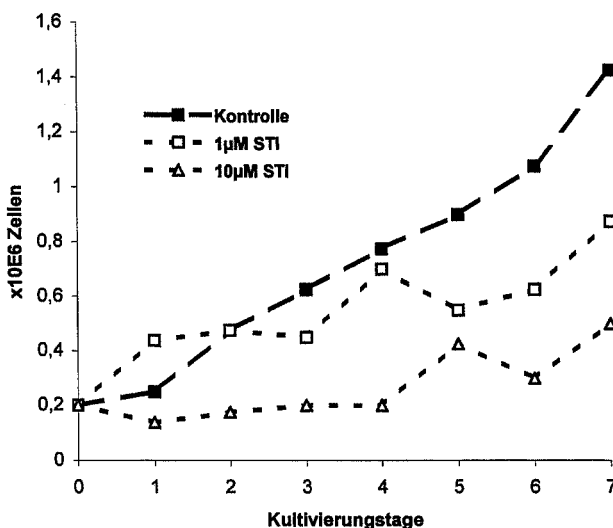


Abb. 8: Wirkung von STI 571 auf das Wachstum der m-BCR-ABL Zelllinie SD1. In Kultur mit  $1\mu\text{M}$  STI zeigt SD1 eine deutlich geminderte Proliferation aber keine Komplette Wachstumsinhibition. Durch Anheben der Konzentration auf  $10\mu\text{M}$  lässt sich der Proliferations-mindernde Effekt von STI verstärken es kommt aber auch hier zu keiner kompletten Wachstumsinhibition.

### **4.3 Versuch der Selektion resistenter Subclone der Zelllinien SD1 und BV173**

Die Beobachtung, dass es unter der Wirkung von STI zu einer Inhibition des Wachstums der Zelllinien BV173 und SD1 kommt, ist ermutigend. In beiden Zellkulturen ist aber keine komplette Eradikation der ALL-Blasten zu beobachten. Eine naheliegende Erklärung für diese Beobachtung ist die Selektion eines resistenten Klons unter Kultur mit STI. Um diese Vermutung zu untersuchen, führten wir eine Reexposition der Zelllinien BV173 und SD1 gegenüber STI durch.

In einer ersten Kultivierungsperiode wurden BV173 und SD1 mit 5 $\mu$ M STI kultiviert. Anschließend wurden dieselben Zellkulturen ohne STI kultiviert. Im Anschluß erfolgte eine erneute Kultivierung der Zelllinien mit 5 $\mu$ M STI. Im Falle der Selektion eines resistenten Klons unter Kultur mit STI wäre bei Reexposition der Zelllinien gegenüber STI eine Inhibitor-unabhängige Proliferation zu erwarten.

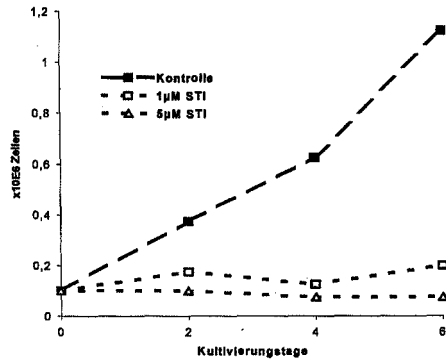
#### **4.3.1 Versuch der Selektion resistenter Subclone mit BV173**

BV173 zeigt bei Reexposition gegenüber STI keine geändertes Wachstumsverhalten. Wie in der primären Kulturphase mit STI zeigt BV 173 in der sekundären Kulturphase mit 5 $\mu$ M Kinase-Inhibitor eine Inhibition der Proliferation. Diese Beobachtung spricht gegen die Selektion eines resistenten Klons durch Kultur mit STI (Abb. 9).

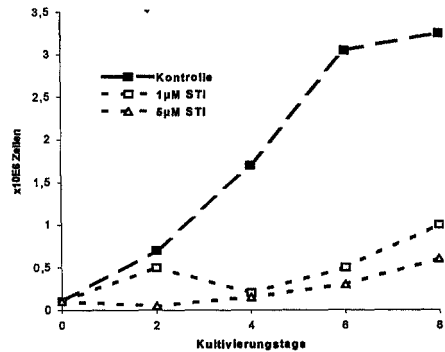
#### **4.3.2 Versuch der Selektion resistenter Subclone mit SD1**

Wie BV173 zeigt auch SD1 keine Änderung des Wachstumsverhaltens bei Reexposition gegenüber STI (Abb. 10). Aus diesem Grund ist auch hier nicht von der Selektion eines resistenten Subklons durch STI auszugehen.

BV 173-  
Verlauf bei  
Erstexposition  
mit 1µM und  
5µM STI571



BV 173-  
Verlauf nach  
Entfernung  
des Kinase-  
Inhibitors  
STI571 aus  
der Kultur



BV 173-  
Verlauf nach  
Reexposition  
mit dem  
Kinase-  
Inhibitor  
(1µM, 5µM)

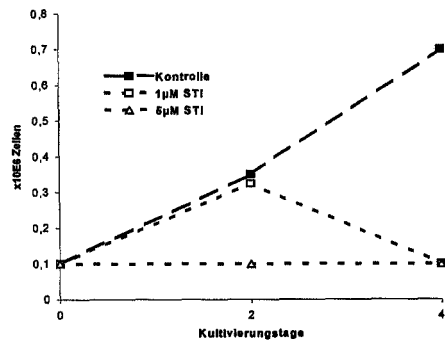
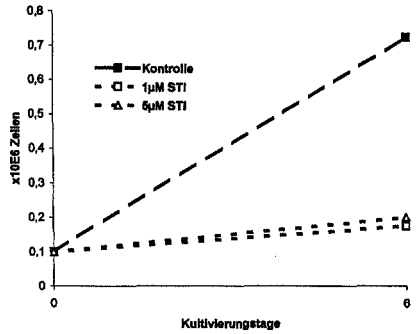
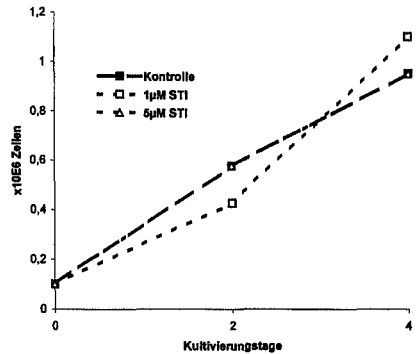


Abb. 9: Reexpositionsversuch mit BV173. Auch bei Reexposition von BV173 gegenüber STI zeigt sich eine deutliche Wachstumsinhibition.

SD1-  
Verlauf bei  
Erstexposition  
mit 1 $\mu$ M und  
5 $\mu$ M STI571



SD1- Verlauf  
nach  
Entfernung  
des Kinase-  
Inhibitors  
STI571 aus  
der Kultur



SD1- Verlauf  
nach  
Reexposition  
mit dem  
Kinase-  
Inhibitor (1 $\mu$ M,  
5 $\mu$ M)

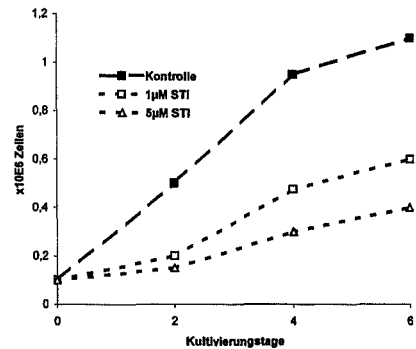


Abb. 10: Reexpositionsversuch mit SD1. Auch bei Reexposition von SD1 gegenüber STI zeigt sich eine deutliche Wachstumsinhibition.

#### 4.4 Wirkung von STI571 auf primäre leukämische Blasten

Es werden Versuche mit Zellen von 8 Patienten, die an einer Ph+ ALL erkrankt waren, beschrieben. Die Diagnose einer B-Vorläuferzelleukämie wurde entsprechend den Kriterien der deutschen multizentrischen ALL-Studiengruppe (GMALL) [Ludwig WD et al., 1998] gestellt. Weiterhin konnte bei allen Patienten die Translokation (9;22) mittels konventioneller Zytogenetik und/oder PCR dargestellt werden. Die molekularbiologische Analyse der BCR-ABL Translokation wurde unabhängig in zwei zentralen Studienlabors in Berlin und Ulm vorgenommen und ergab übereinstimmend in allen Fällen den kleinen Bruchpunkt (P190), der typisch für die ALL ist.

Blut (3/8) und Knochenmarkproben (5/8) wurden mit konservierungsmittelfreiem Heparin als Antikoagulanzen asserviert. Die mononukleären Zellen wurden mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation separiert und in RPMI mit 10% FCS und 10% DMSO kryoasserviert.

Zum Zeitpunkt der Probenentnahme befanden sich 3 Patienten in kompletter zytologischer Remission; eine Patient im 1. Rezidiv nach autologer PBSC Transplantation und bei 4 Patienten wurden die Proben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer Ph+ALL entnommen.

Die Charakteristika der Patienten sind in folgender Tabelle dargestellt (Tab. 17).



Pat. ID	Alter <sup>1</sup>	Sex	ALL Subtyp	Quelle der Zellen	Leuko- zyten/nl <sup>1</sup>	Blasten in PB <sup>1</sup> (%)	Blasten im KM/PB <sup>2</sup> (%)	Status der ALL <sup>1</sup>	BCR- Typ	Immunphänotyp (bei Diagnose)							
										TdT	CD19	CD20	CD10	CD34	CD33	CD13	cylg
C.H.	55	F	c-ALL	PB	285.5	91	KM 98%	DX	P190	90	95	50	95	72	0	0	0
P.V.	32	M	c-ALL	KM	18.4	80	KM 38%	REL1	P190	90	81	34	86	85	11	78	6
P.P.	30	F	c-ALL	PB	22	46		DX	P190	65	65	42	60	55	3	6	6
D.R.	57	M	c-ALL	KM	51	82	KM 89%	DX	P190	62	89	12	80	2	38	77	4
W.N.	56	M	Prae-B	KM	31.2	81	KM100%	DX	P190	90	97	10	96	97	1	10	80
R.G.	43	F		KM	21.9	46	<5%	CR1	P190								
U.N.	39	M	c-ALL	KM	3.8	6	<5%	CR1	P190	52	75	6	78	78	60	13	0
I.Z.	43	F	Prae-B	PB	51	99		CR1	P190	70	85	75	82	23	20	1	58

<sup>1</sup> bei Erstdiagnose

<sup>2</sup> Zum Zeitpunkt der aktuellen Analyse

PB= peripheres Blut

DX= Diagnose

CR1= erste komplette Remission

REL= erstes Rezidiv

Tab. 17 Charakteristika der Patienten und Übersicht über den immunologischen Phänotyp der in Kultur genommenen primären Zellen. Alle Patienten wiesen den kleinen für die ALL typischen Bruchpunkt auf.

#### 4.4.1 Primäre Kulturphase Ph+ ALL-Blasten mit STI571 in Suspensionskultur

Es wurden morphologisch homogene Ph+ Lymphoblasten (>95% Reinheit) von 4 Patienten bei Erstdiagnose einer Ph+ALL und Lymphoblasten eines Patienten im 1. Rezidiv einer Ph+ALL über einen Zeitraum von 6 Tagen mit und ohne 5µM STI unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert. Unter der Wirkung des Kinase-Inhibitors STI571 kommt es zu einer Reduktion der Blasten in den Kulturen zwischen 23 und 95,5%. Die ohne STI geführten Kontrollen zeigen eine Reduktion der Blastenzahl um 8%-90% (Tab. 18). Der Trend zu einer stärkeren Reduktion der ALL-Blasten unter der Wirkung von STI571 verglichen mit den Negativkontrollen erreicht keine statistische Signifikanz. Die mittlere Reduktion der ALL-Blasten liegt in den Negativkontrollen bei 49% mit einer Standardabweichung (SEM) von 13%.

Die mittlere Reduktion der ALL-Blasten Zahl unter der Wirkung von STI571 hingegen liegt bei 65% mit einer Standardabweichung von 13%. Aus diesem Grund kann von keiner statistischen Signifikanz ausgegangen werden ( $p=0.41$ ) (Tab. 18)..

Weiterhin wurden mononukleäre Zellen von Patienten im Stadium einer kompletten Remission mit und ohne 5µM STI kultiviert. Hierbei zeigt sich unter der Wirkung von STI eine Reduktion der mononukleären Zellen von 72%-90%. Die Negativkontrollen zeigen hier eine Reduktion von 60-90%. Statistisch erreicht auch in diesen Kulturen STI keine signifikante Reduktion der Zellzahl. Der Mittelwert der Reduktion liegt bei den mit STI geführten Kulturen bei 81% mit einer Standardabweichung von 5%. Bei den Negativkontrollen liegt der Mittelwert bei 71% bei einer Standardabweichung von 6%. Somit ist keine signifikante Reduktion unter der Wirkung von STI eruierbar ( $p=0.27$ ) (Tab. 18).

Pat. ID	Status	Tag 0	Viable Zellen / ml - Tag 6			
			-STI 571	% von Tag 0	+STI571	% von Tag 0
C.H.	DX	1x10 <sup>5</sup>	5,5x10 <sup>5</sup>	55	5,5x10 <sup>5</sup>	55
P.V.	REL1	1x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>	60	2,2x10 <sup>5</sup>	20
P.P.	Dx	4x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>5</sup>	10	1,9x10 <sup>5</sup>	4,5
D.R.	Dx	1x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>5</sup>	40	1,75x10 <sup>5</sup>	17,5
W.N.	Dx	1.2x10 <sup>5</sup>	11x10 <sup>5</sup>	92	9,2x10 <sup>5</sup>	77
<b>Mittelwert + SEM</b> (Patienten C.H., P.V., P.P., D.R., W.N.)				51±13	P=0,41	35±13
R.G.	CR1	1x10 <sup>5</sup>	2,75x10 <sup>5</sup>	27,5	2,75x10 <sup>5</sup>	27,5
U.N.	CR1	1x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>5</sup>	40	2,0x10 <sup>5</sup>	20
I.Z.	CR1	1x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	20	1,0x10 <sup>5</sup>	10
<b>Mittelwert + SEM</b> (Patienten R.G., U.N., I.Z.)				29±6	P=0,27	19±5

Tab. 18: Übersicht über das Proliferationsverhalten der kultivierten primären Ph+ALL-Blasten mit und ohne STI571.

#### 4.4.2 Sekundäre Kulturphase Ph+ ALL-Lymphoblasten ohne STI571

Um den Einfluß von STI571 auf die Subpopulation leukämischer Progenitorzellen zu untersuchen wurden, die Zellen in eine sekundäre Kulturphase überführt, die für die Proliferation von leukämischen Progenitorzellen optimiert war. Die Kulturen wurden ohne STI571 auf einem Fibroblastenstroma (NIH3T3), das zuvor mit CD40-Ligand transfiziert worden war, in Anwesenheit von IL3 und IL7 gehalten. Der positive Einfluß eines stromalen Supports sowie der Interleukine IL3 und IL7 auf die Proliferation leukämischer Progenitorzellen ist von verschiedenen Arbeitsgruppen vorbeschrieben [Whitlock CA et al., 1987; Palacios R et al., 1989; Namen AE et al., 1988; Suda T et al., 1989; Widmer MB et al., 1990; Takeda S et al., 1989; Nishikawa S et al., 1988; Strasser A et al., 1989]

#### 4.4.3 RT-PCR-Analyse der BCR-ABL-Expression

Die Sekundärkultur wurde zwischen 6 und 18 Tage fortgeführt, so dass die gesamte Kulturdauer zwischen 12 und 24 Tage betrug. Während dieses Zeitraumes wurde sukzessive die Analyse der BCR-ABL-Expression mittels RT-PCR durchgeführt. Von

3 der insgesamt 5 ALL-Proben, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oder des 1.Rezidivs entnommen worden waren, war es möglich zu verschiedenen Zeitpunkten genügend RNA für eine RT-PCR zu extrahieren (Patienten C.H., P.V., P.P., D.R.). Hierbei zeigen die Kulturen, die in der initialen Kultivierungsperiode ohne STI571 kultiviert worden waren (Negativkontrollen), ein positives Signal für BCR-ABL ohne Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Analyse.

Hingegen kommt es im Verlauf der sekundären Kulturphase unter dem Einfluss von 5µM STI571 zu einer deutlichen Reduktion der BCR-ABL Expression, die in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer zunahm. Während am Kultivierungstag 12 BCR-ABL in den Kulturen, unabhängig von einer initialen STI571-Exposition, nachweisbar ist, zeigt sich an Tag 14 (P.V.) und 18 (C.H.) kein oder ein äußerst geringes Signal für BCR-ABL. Im Vergleich hierzu zeigen die Negativkontrollen ein deutlich positives Signal (Abb. 11, Abb. 12).

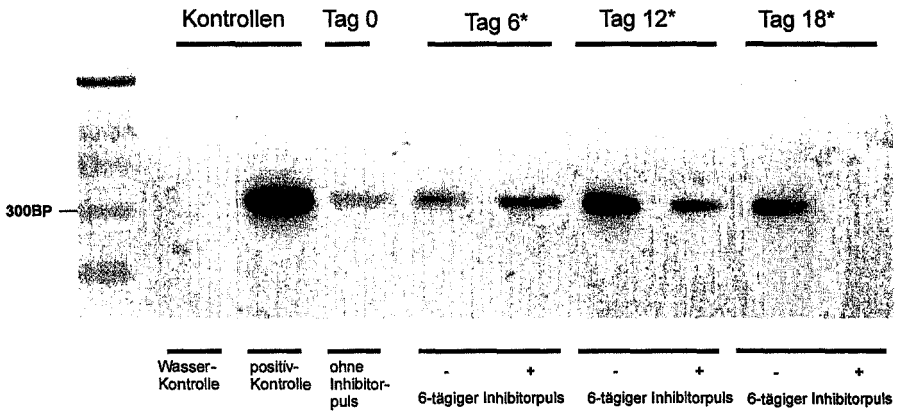
Auch wenn die RNA-Extraktion zu einem späteren Zeitpunkt (Tag24, Pat. P.P.) erfolgt, zeigt sich in der RT-PCR ein deutlich positives Signal in der Negativkontrolle, während die in der primären Kultivierungsphase mit 5µM STI571 gehaltene Zellkultur kein Signal für BCR-ABL aufweist (Abb. 13).

#### **4.4.4 RT-PCR-Analyse der Patienten in Zustand der kompletten Remission**

Knochenmark und periphere Blutzellen von Patienten in kompletter Remission einer Ph+ ALL wurden in gleicher Weise kultiviert (Patienten R.G., U.N., I.Z.). In einem Fall (Patient R.G.) war es möglich, am Kultivierungstag 24 genügend RNA für eine RT-PCR zu extrahieren. Wie an Tag 0 der Kultivierung zeigt die PCR kein Signal für BCR-ABL. In der „nested“ PCR zeigt sich sowohl am Kultivierungstag 0 als auch an Tag 24 eine deutliche Bande. Die Ergebnisse belegen, dass sich der Patient R.G. zum Zeitpunkt der Probenentnahme in einer kompletten Remission befand. Dies erklärt die negative BCR-ABL-RT-PCR an Tag 0. Die hochsensible „nested“ PCR hingegen zeigt zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine deutliche Bande, was belegt, dass auch zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch BCR-ABL-positive Zellen im Knochenmark vorhanden waren. Die BCR-ABL-Expression ist auch nach 24-tägiger Kultur und initialer 6-tägiger Kultur mit 5µM STI571 noch nachweisbar. Diese Beobachtung belegt, dass es unter der Wirkung von STI571 auch im Falle

einer kompletten Remission nicht zur Eradikation residueller ALL-Blasten kommt (Abb. 14).

### BCR-ABL-PCR von Pat. C.H.



### $\beta$ -Aktin-PCR von Pat. C.H.

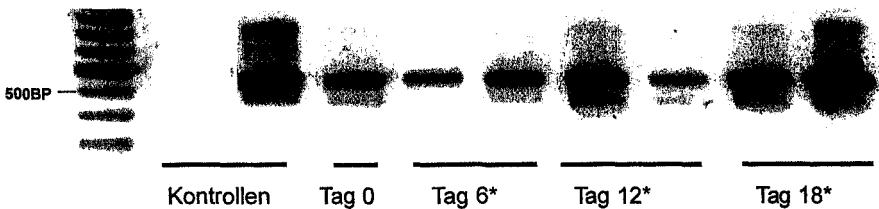
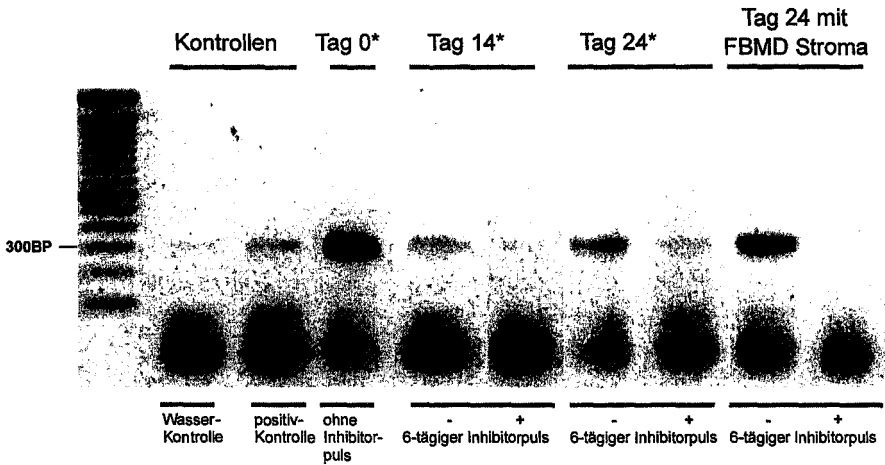


Abb. 11: RT-PCR-Analyse der Expression von BCR-ABL während der Kultur primärer ALL-Blasten des Patienten C.H. Es erfolgte eine Exposition des Ph<sup>+</sup> ALL-Blasten gegenüber 5 $\mu$ M STI während einer initialen Kulturphase (Tage 0-6). Ab Tag 7 erfolgte die Kultur der Zellen ohne den Kinase Inhibitor mit stromalen Support durch die Zelllinie NIH3T3 und Zugabe der Interleukine 3 und 7. Ab Kultivierungstag 18 lässt sich keine BCR-ABL-Expression mittels RT-PCR in der zuvor mit STI571 geführten Kultur nachweisen. Die Negativkontrolle zeigt hingegen eine deutliche BCR-ABL-Expression

### BCR-ABL-PCR von Pat. P.V.



### $\beta$ -Aktin-PCR von Pat. P.V.

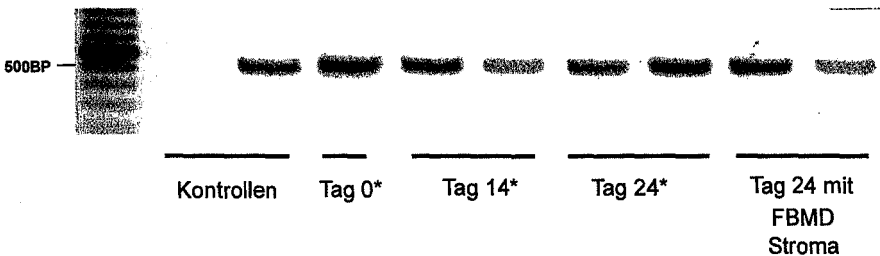


Abb. 12: RT-PCR-Analyse der Expression von BCR-ABL während der Kultur primärer ALL-Blasten des Patienten P.V. Es erfolgte eine Exposition der Ph<sup>+</sup> ALL-Blasten gegenüber 5 $\mu$ M STI während einer initialen Kulturphase (Tage 0-6). Ab Tag 7 erfolgte die Kultur der Zellen ohne den Kinase Inhibitor mit stromalen Support durch die Zelllinie NIH3T3 und Zugabe der Interleukine 3 und 7. Ab Kultivierungstag 14 lässt sich nur noch eine minimale BCR-ABL-Expression mittels RT-PCR in der zuvor mit STI571 geführten Kultur nachweisen. Die Negativkontrolle zeigt auch hier eine deutliche BCR-ABL-Expression

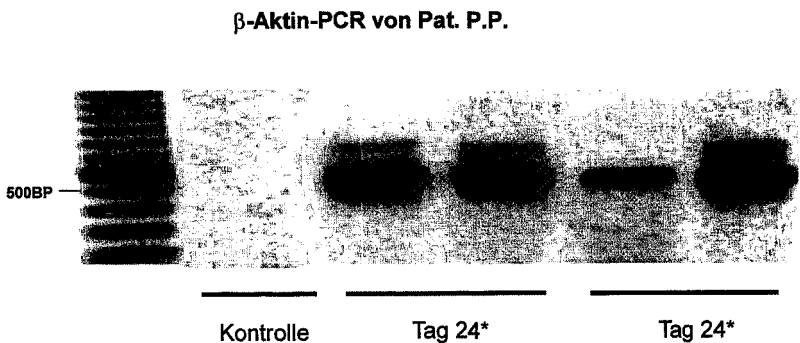
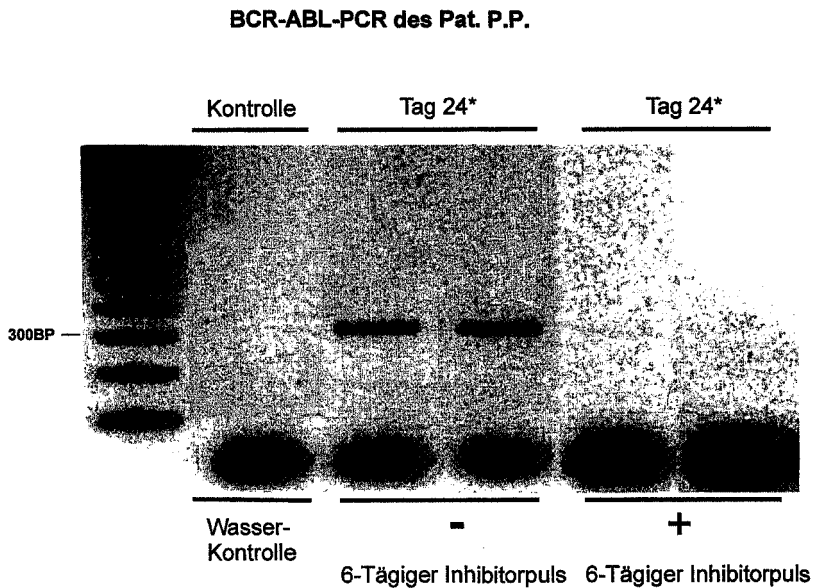
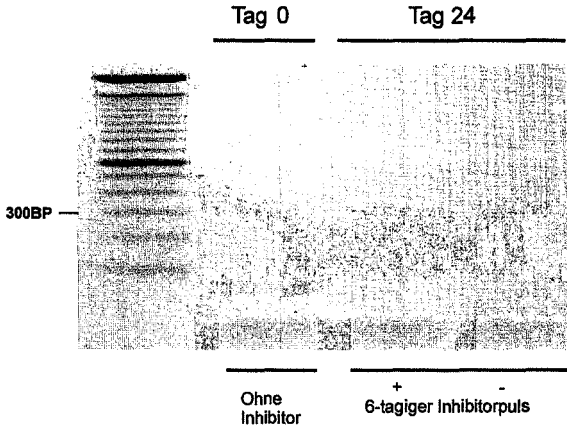


Abb. 13: Rt-PCR-Analyse der Expression von BCR-ABL während der Kultur primärer ALL-Blasten des Patienten P.P. Die Kultivierungsbedingungen waren identisch mit denen der Patienten C.H. und P.V. Die RT-PCR-Analyse erfolgte aber nur an Kultivierungstag 24; mit einem ähnlichen Ergebnis wie bei den Patienten C.H. und P.V.: Die initial mit STI gehaltenen Kulturen zeigen an Kultivierungstag 24 keine BCR-ABL-Expression, während die Negativkontrollen BCR-ABL deutlich exprimieren



**BCR-ABL-PCR des Pat. R.G. (C.R.-Situation)**



**„Nested“ BCR-ABL-PCR des Pat. R.G.**

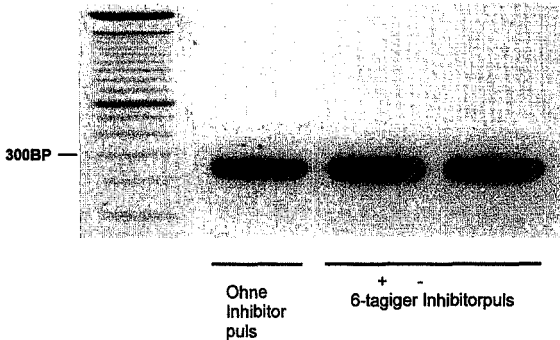
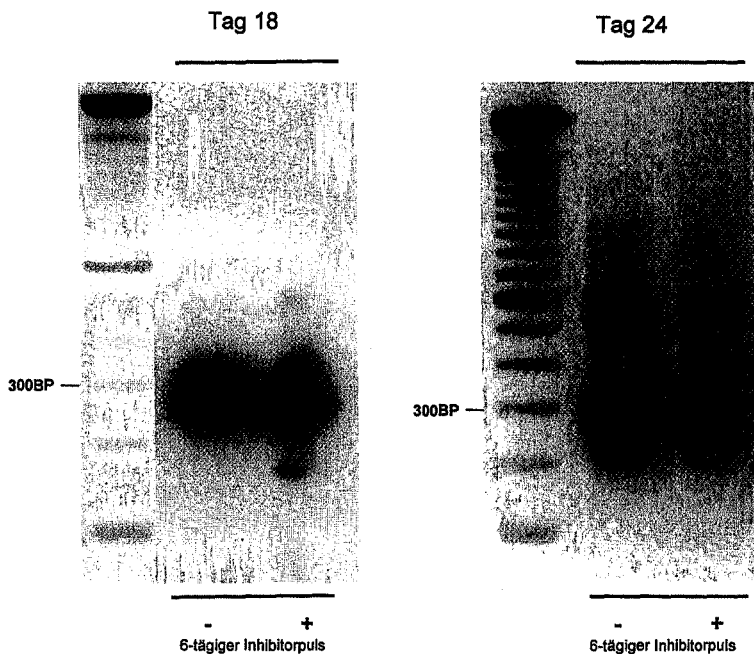


Abb. 14: Rt-PCR-Analyse der Expression von BCR-ABL während der Kultur primärer ALL-Blasten des Patienten R.G. Die Probenentnahme erfolgte zum Zeitpunkt einer kompletten Remission, was die fehlende BCR-ABL-Expression an Tag 0 bestätigt. Die sensitivere „nested“-PCR zeigt hingegen ein positives Signal für BCR-ABL. An Tag 24 ist in der „nested“-PCR weiterhin eine BCR-ABL-Expression sowohl in der initial mit STI gehaltenen Kultur, als auch in der Negativkontrolle nachweisbar

#### 4.5 Ergebnisse der „nested“ BCR-ABL-PCR

Um festzustellen, ob es unter dem Einfluß von STI571 zu einer kompletten Eradikation BCR-ABL positiver Blasten gekommen ist, wurden die RT-PCR-Produkte der Patienten C.H. und P.P., bei denen mittels herkömmlicher PCR kein Nachweis für BCR-ABL möglich war, mittels einer hochsensitiven „nested“ PCR untersucht. Mit dieser hochsensitiven Methode ist es möglich, auch vereinzelte BCR-ABL positive Zellen innerhalb einer Kultur von  $10^7$  Zellen zu detektieren. Mittels nested PCR war BCR-ABL in beiden Fällen nachweisbar.

**„nested“-PCR-Ergebnisse der Patienten C.H. und P.P.**



**Abb. 15: Ergebnisse der „nested“ PCR der Patienten C.H. (links, Tag 18) und P.P. (rechts, Tag 24). Bei beiden Patienten zeigt die hochsensitive „nested“ PCR eine deutliche Bande.**

#### 4.6 Einfluß von STI571 auf normale hämatopoetische Stammzellen

Da ein essentielles Kriterium für die Verwendung von STI571 im Rahmen eines in vitro Purgings nicht nur die möglichst effektive Elimination maligner Blasten sondern auch eine hohe Selektivität ist, wurde der Einfluss von STI571 auf normale hämatopoetische Vorläuferzellen untersucht. Begründet werden die Untersuchungen weiterhin dadurch, dass von STI571 neben der gewünschten Inhibition der BCR-ABL-Kinase eine Inhibition des Stammzellfaktorrezeptors c-kit bekannt ist. Dies könnte erheblichen Einfluss auf das Überleben und die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen haben, was die klinischen Anwendungsmöglichkeiten von STI571 einschränken würde.

Um diese Problematik zu untersuchen wurden Versuche zur Kultivierung von koloniebildenden und langzeitrepopulativen Zellen (CFU-Assays und LTCIC-Assays) durchgeführt. Zellen von insgesamt 6 Patienten wurden vor und nach Kultur mit und ohne 5µM STI571 und ohne stromalen Support in Kultur genommen. Bei 2 von 6 Patienten wurden die Zellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer Ph+ALL entnommen. 1 Patient befand sich bei Probenentnahme im ersten Rezidiv einer Ph+ALL. 3 Patienten befanden sich in kompletter Remission.

Abbildungen 15 und 16 sowie Tabelle 19 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Einfluss von STI571 auf die Cloning-Efficiency. Da es aber unter der Wirkung von STI571 zu einer Reduktion der Zellzahl gekommen war, zeigt auch die Anzahl der Kolonie-bildenden Zellen (CFC) im Vergleich zur Negativkontrolle eine statistisch nicht relevante Reduktion (Mittlere CFC-Zahl ohne STI:  $77 \pm 72$ , CFC-Zahl mit STI  $45 \pm 49$ ,  $p=0,39$ ) (Tab. 19 und Abb. 15 und 16).

Pat. ID	Status	Anzahl der CFC-GM $\pm$ SD/ml		
		Tag 0	Tag 6	
			- STI571	+ STI571
P.V.	REL1	187 $\pm$ 70	180 $\pm$ 0	57 $\pm$ 23
D.R.	Dx	120 $\pm$ 0	40 $\pm$ 4	17 $\pm$ 7
W.N.	Dx	NA	4	4 $\pm$ 2
R.G.	CR1	300 $\pm$ 69	152 $\pm$ 25	139 $\pm$ 18
U.N.	CR1	73 $\pm$ 42	64 $\pm$ 29	39 $\pm$ 6
I.Z.	CR1	530 $\pm$ 82	22 $\pm$ 4,5	12 $\pm$ 2,2
Mean $\pm$ SD		242 $\pm$ 182	77 $\pm$ 72	45 $\pm$ 49
			p=0,39	

Tab. 19: Ergebnisse der CFU-Assays. Da es aber unter der Wirkung von STI571 zu einer Reduktion der Zellzahl gekommen war, zeigt auch die Anzahl der kolonie-bildenden Zellen (CFC) im Vergleich zur Negativkontrolle eine statistisch nicht relevante Reduktion.

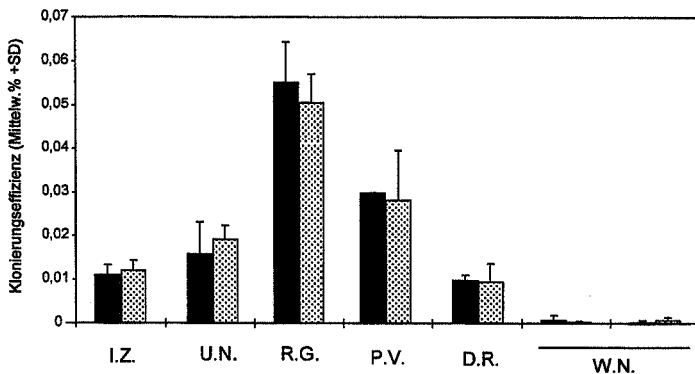


Abb. 16: Klonierungseffizienz (MW %  $\pm$  SD) normaler hämatopoetischer Progenitorzellen von 6 Patienten mit BCR-ABL<sup>+</sup> ALL (3 in CR1, 1 im Rezidiv, 2 bei Diagnose) nach 6-tägiger Suspensionskultur mit oder ohne 5µM STI571. Die Zellen wurden an Tag 6 geerntet und in Methylzellulose Kulturen (4-fach Werte) überführt. CFU-GM, BFU-E und gemischte Kolonien (CFU-Mix) wurden an Tag 14 gezählt. Zur Berechnung der Klonierungseffizienz siehe Materialien und Methoden; es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kulturen mit oder ohne STI571 ( $p=0.98$ ,  $t$ -test).

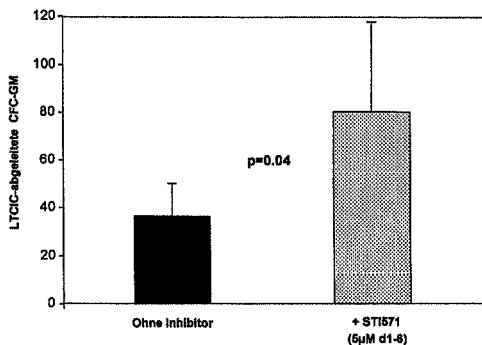


Abb. 17: Einfluß des ABL-Tyrosinkinaseinhibitors STI571 auf normale LTCIC-abgeleitete CFC-GM von 3 Patienten mit BCR-ABL<sup>+</sup> ALL. Nach 5 wöchiger Langzeitkultur auf bestrahlten (80Gy) Stromaschichten (M2-10B4 oder FBMD-1 Zellen), wurden Zellen von bis zu 6 Kulturlöchern geerntet und gemischt, und 0,5 bis  $2,0 \times 10^5$  Zellen wurden in semisoliden Kulturen transferiert. Kolonien wurden zwischen Tagen 12 und 14 ausgezählt, und die Zahl der LTCIC-abgeleiteten CFC je ml der Kultur wurde wie in Materialien und Methoden beschrieben kalkuliert.

## 5 Diskussion

Die wichtige Rolle der deregulierten Tyrosin-Kinase Aktivität durch das Onkogen BCR-ABL ist ein attraktiver Ansatzpunkt für innovative Therapiekonzepte der BCR-ABL-positiven Leukämien. Da zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit noch keine Daten über die Wirkung von STI571 bei der Ph+ALL bekannt waren, war es ein primäres Ziel der beschriebenen Experimente, die Wirkung des ABL-Tyrosinkinaseinhibitors STI571 auf das *in vitro* Wachstum und Überleben von Ph+ALL-Zelllinien und primären Ph+ALL-Blasten zu untersuchen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob STI571 auch in einer Purging-Situation bei autologen Stammzelltransplantationen zu einer Reduktion der Ph+ ALL-Blasten führen könnte. Da die Verwendung von STI571 in einer Purging-Situation voraussetzt, dass durch den Inhibitor keine Beeinträchtigung der Proliferation und der Viabilität von normalen hämatopoetischen Progenitor Zellen erfolgt, wurde auch die Wirkung von STI auf diese Zellpopulationen untersucht.

### 5.1 Versuche mit Zelllinien

STI erweist sich auch in den beschriebenen Versuchen als ein potenter Inhibitor des BCR-ABL-Proteins, der eine spezifische Wachstumsinhibition von BCR-ABL-Zelllinien bewirkt.

Die Zelllinie BV173, die von einem Patienten mit Ph+ ALL stammt und den großen Bruchpunkt von BCR-ABL (M-BCR-ABL) aufweist, zeigt in Kultur mit 1µM, 5µM und 10µM STI eine deutliche Reduktion des Wachstums im Vergleich zu der Kultur ohne STI. Weiterhin belegen die <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporationsversuche eine starke Reduktion der Proliferation. Die 7AAD-Apoptose-Assays zeigen einen starken Anstieg der apoptotischen Zellpopulation in den STI-haltigen Kulturen. Die Beobachtung stehen im Einklang mit den von anderen Autoren beschriebenen Wirkungen von STI auf Ph+Zelllinien [Buchdunger et al., 1996; Druker et al., 1996; Gambacorti-Passerini et al., 1997].

Die Spezifität der durch STI vermittelten Wachstumsinhibition wird durch die Versuche mit der BCR-ABL-negativen Zelllinie SEM dargestellt. SEM zeigt in Kultur mit 1µM und 10µM STI keine Minderung des Wachstums und keine signifikante

Zunahme apoptotischer Zellen. Die  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporationsversuche belegen hingegen in Kultur mit  $10\mu\text{M}$  STI eine leichte Abnahme der Proliferationsrate.

Obwohl es unter der Wirkung von STI zu einer deutlichen Wachstumsinhibition BCR-ABL positiver Zelllinien kommt, ist eine komplette Eradikation der viablen Blasten nicht zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass ein Teil der kultivierten Zellen der Wirkung von STI entgehen kann. Erklärbar wäre die Beobachtung durch die Selektion eines STI-resistenten Klons oder Subklons. Es sind verschiedene Mechanismen der STI-Resistenz bekannt [Weisberg E et al., 2001]. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren im Bereich der Kinasen-Domäne von ABL kann es zu einer Resistenz des BCR-ABL-Proteins gegenüber STI kommen [Gorre ME et al., 2001; Hofmann WK et al., 2002].

Eine weitere Erklärung für das Überleben einer residuellen Zellpopulation unter der Wirkung von STI ist die Beobachtung, dass STI nur eine apoptotische Wirkung auf Zellen aufweist, die sich in der Synthesephase bzw. Zellteilung befinden. Auf ruhende Zellen, die sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden, hat STI keine Apoptose-induzierende Wirkung [Graham SM et al., 2002]. Die residuellen viablen Zellen könnten sich also in der G0-Phase befinden und so der Wirkung von STI entkommen.

Ob die residuellen Zellen, in den von mir durchgeführten Experimenten, einen STI-resistenten Klon darstellen, wurde mittels Reexposition gegenüber STI untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Zellen, die in einer initialen Kultur mit STI der Wirkung des Kinase Inhibitors entgangen sind, nach Entfernung des Inhibitors erneut in die exponentielle Wachstumsphase übergehen. Bei erneuter Exposition gegenüber STI zeigt sich wiederum eine deutliche Wachstumsinhibition. Diese Beobachtung lässt die Selektion eines STI-resistenten Klons während der ersten Kulturperiode als unwahrscheinlich erscheinen. Die Vermutung, dass sich die residuellen Blasten in der G0-Phase des Zellzyklus befinden und aus diesem Grund der Wirkung von STI entgehen, erscheint wahrscheinlicher.

Die Zelllinie SD1, stammend aus einer Ph+ ALL mit dem kleinen Bruchpunkt von BCR-ABL (m-BCR-ABL), zeigt im Vergleich zu der M-BCR-ABL-Zelllinie BV173 eine höhere Toleranz gegenüber der Wirkung von STI. Es ist zwar in Kultur mit  $1\mu\text{M}$  STI ein deutlicher Inhibitionseffekt zu erkennen, dieser ist aber wesentlich geringer als bei BV173. In Kultur mit  $10\mu\text{M}$  STI zeigt die Zelllinie eine ähnlich starke Inhibition des



Wachstums wie BV173. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es zur Wachstumsinhibition der m-BCR-ABL Zelllinie SD1 höherer Dosen STI bedarf als zur Inhibition von BV173. Erklärbar wäre die Beobachtung durch die höhere Aktivität des m-BCR-ABL-Proteins (P190) im Vergleich zu P210 [Li S et al., 1999]. Das Phänomen korreliert weiterhin sehr gut mit der Beobachtung, dass Zelllinien, die hochgradig BCR-ABL exprimieren, eine höhere Resistenz gegen STI aufweisen, und dass ein deutlicher Inhibitionseffekt nur durch höhere Konzentrationen von STI erreicht wird [Keeshan K et al., 2001].

Wie bei BV173 zeigt sich auch bei SD1 in Kultur mit 10µM STI eine Population viabler Zellen, auf die der Kinase-Inhibitor keinen apoptotischen Effekt hat.

Die Effektivität der durch STI vermittelten Inhibition wurde weiterhin mittels Phosphotyrosinblots der Leukämiezelllinien BV173, SD1 und SEM (Kontrollzelllinie ohne BCR-ABL-Translokation) dargestellt (Daten nicht gezeigt). Hierbei ließ sich unter der Wirkung von STI eine signifikante Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von p185/p210 sowie eine generalisierte Abnahme der Tyrosinphosphorylierung anderer Proteine in den Kulturen von SD1 und BV173 nachweisen. Die Kulturen von SEM zeigten keine Unterschiede der Tyrosinphosphorylierung unter dem Einfluß von STI. Diese Beobachtungen unterstreichen, dass es unter der Wirkung von STI zu einer suffizienten Inhibition des BCR-ABL-Proteins kommt. Aus der Inhibition resultiert eine Minderung der Tyrosinphosphorylierung von stromabwärts gelegenen Proteinen.

## 5.2 Versuche mit primären ALL-Blasten

Um die durch STI571 vermittelten Effekte in einer Purging Situation zu untersuchen, wurde ein zwei Phasen Kultursystem entwickelt, in dem in einer primären Kultivierungsphase versucht wurde, eine maximale Reduktion der Ph<sup>+</sup> Blasten zu erreichen. In einer zweiten prolongierten Kultivierungsphase wurde durch Kultivierung auf einem Fibroblastenstroma und durch Zugabe verschiedener Zytokine das Überleben und die Proliferation von Vorläuferzellen gefördert.

In dieser ersten Kultivierungsperiode wurden morphologisch homogene BCR-ABL-positive Lymphoblasten (>95% Blasten) für 6 Tage kultiviert. Hierbei wurden Kultivierungsbedingungen ohne Zugabe von IL7 und ohne Fibroblastenstroma gewählt, die suboptimal für das Wachstum von leukämischen Progenitor-Zellen sind,

aber geeignet für die Expansion von normalen hämatopoetischen Progenitorzellen sind [Eder M et al., 1992]. Erwartungsgemäß kommt es unter diesen Kultivierungsbedingungen zu einer raschen Abnahme der viablen Zellen sowohl in den Kulturen mit STI als auch ohne STI. Auffällig ist, dass unter der Wirkung des Kinase-Inhibitor STI571 keine signifikante Beschleunigung der Zellzahl-Reduktion im Vergleich zu der Zellkultur ohne STI stattfindet. Bestätigt wird diese Beobachtung durch eine am Kultivierungstag 6 durchgeführte RT-PCR, die den Nachweis von BCR-ABL sowohl in der STI-haltigen Kultur, als auch in der Kultur ohne STI erbrachte. Eine vergleichbare Wirkung von STI, wie beobachtet in den Versuchen mit Zelllinien, konnte nicht reproduziert werden. Druker et al. beschreiben hingegen eine suffiziente Inhibition von primären CML-Blasten bei Kultivierung mit STI. Ursachen für die geringere Effizienz von STI in Kulturen mit Primären Ph+ ALL-Blasten kann auch hier die höhere Aktivität von m-BCR-ABL (P190) im Vergleich zu M-BCR-ABL(p210) sein [Li S et al., 1999], die zu einer erhöhten Toleranz der Zellen gegenüber STI führt [Keeshan K et al., 2001]. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass die höhere Kinase-Aktivität von P190 alleinige Ursache für die mangelnde Effizienz von STI ist, da bereits die suffiziente Inhibition von m-BCR-ABL (P190) mittels Phosphotyrosin-Western Blots nachgewiesen wurde. Es gibt diverse andere Gründe, die die divergente Wirkung von STI auf primäre ALL-Blasten und Zelllinien erklären können. Die Beobachtung von Graham SM et al., dass STI nur in Zellen Apoptose auslöst, die sich in der Synthesephase bzw. Zellteilung befinden, trägt zur Erklärung der Beobachtung bei. Da die primären ALL-Blasten unter suboptimalen Kultivierungsbedingungen ohne adäquate Stimulation durch Cytokine und ohne Fibroblastenstroma-Support keine Expansion zeigten, befanden sich vermutlich nur sehr wenige Zellen in der Teilungs- oder Synthese-Phase. Möglicherweise konnte STI aus diesem Grund seine apoptotische Wirkung auf die ALL-Blasten nicht entfalten.

Eine weitere Erklärung für die mangelnde Effizienz von STI könnte die Aktivierung zusätzlicher Signalkaskaden sein, die zum Überleben der Zelle beitragen. Die Beobachtung dass verschiedene BCR-ABL-positive Zelllinien variable Inhibitionen durch STI aufweisen [Druker BJ et al., 1996; Le Coutre P et al., 2000; Mahon FX et al., 2000], kann darauf hinweisen, dass es unter der Wirkung zusätzlicher genetischer Veränderungen zur Aktivierung von weiteren Signalkaskaden kommt, die

die Apoptose der Zellen verhindern. Gestärkt wird diese Hypothese durch kürzlich publizierte Beobachtungen einer Resistenz gegenüber STI571 in bis zu 30% aller untersuchten ALL-Patienten. Hierbei war es nicht möglich Mutationen von BCR-ABL zu detektieren, die das Phänomen erklären könnten [Scheuring UJ et al., 2002].

Weiterhin beschreiben Druker BJ et al. unter der Wirkung von STI eine Inhibition von clonalen CML-Progenitor-Zellen, die nur einen Teil der gesamten Population leukämischer Blasten der CML darstellen. Es ist aber bekannt, dass verschiedene Subpopulationen der Blasten in Hinsicht auf Proliferation und Apoptose eine variable Abhängigkeit von der Aktivität der Tyrosinkinase ABL aufweisen. An CML-Blasten, die den großen Bruchpunkt von BCR-ABL (p210) aufwiesen, konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität von BCR-ABL in unreifen CML-Blasten von größerer Bedeutung für das Überleben ist als in reifen CML-Blasten. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass STI seine Wirkung auf unreife leukämische CML-Blasten, die von Druker BJ et al. untersucht worden waren, stärker entfalten kann, als auf die gesamte blastäre Population.

Um die Annahme zu bestätigen, dass es unter der Wirkung von STI zu einer Apoptose der unreifen ALL-Blasten in den beschriebenen Kulturen gekommen war, kultivierten wir die Zellen in einer zweiten Kultivierungsphase ab Tag 6 unter für frühe primäre ALL-Blasten durch Zugabe der Interleukine IL3 und IL7 und Kultivierung der Zellen auf einem Fibroblastenstroma optimierten Bedingungen. STI571 wurde während dieser Klutivierungsperiode aus allen Zellkulturen entfernt. Die Möglichkeit der Expansion maligner hämatopoetischer Stammzellen einer B-Linien ALL bei Co-Kultivierung mit einem Fibroblastenstroma ist 1997 von Nishigaki H et al. beschrieben worden [Nishigaki H. et al., 1997]. Mit Hilfe einer RT-PCR stellten wir fest, dass das BCR-ABL Konstrukt innerhalb der zuvor mit STI geführten Kulturen in den sekundären Kulturen nicht mehr nachweisbar war. Der Verlust von BCR-ABL innerhalb der zuvor mit STI kultivierten Blasten zeigte hierbei eine deutliche Korrelation mit der Kultivierungszeit: Während an Tag 6 und Tag 12 der sekundären Kultur eindeutig noch BCR-ABL mittels RT-PCR nachweisbar war, zeigten alle Kulturen ab Tag 18 des sekundären Kulturintervalls eine starke Reduktion oder eine fehlende Expression von BCR-ABL. Falls die Kultivierung der Zellen über den Tag 18 hinaus erfolgte, zeigte sich an Tag 24 kein BCR-ABL in der RT-PCR. In den zuvor ohne STI geführten Kulturen ließ sich BCR-ABL hingegen zu jedem Zeitpunkt

deutlich nachweisen. Da die Kultivierungsbedingungen sowohl in der primären als auch in der sekundären Kultivierungsperiode mit Ausnahme der Zugabe von STI identisch waren, lässt sich die Elimination von BCR-ABL nur durch die initiale Kultivierung der ALL-Blasten mit STI erklären. Der zeitliche Ablauf der Elimination von BCR-ABL bestätigt die Theorie, dass es während der ersten Kultivierungsperiode unter für ALL-Blasten suboptimalen Bedingungen zur Elimination von vorwiegend unreifen ALL-Blasten durch den ABL-Kinase Inhibitor STI571 kommt. In der zweiten Kultivierungsperiode, die für unreife ALL-Blasten optimierte Kultivierungsbedingungen ohne STI aufweist, kommt es zur Proliferation der ALL-Blasten, die durch die Wirkung von STI keine BCR-ABL positiven Zellen enthalten. Hingegen ist BCR-ABL in den gänzlich ohne STI gehaltenen Kulturen weiterhin nachweisbar. Die Beobachtungen bestätigen in dieser Hinsicht die Annahme, dass STI größere Wirkung auf frühe leukämische Progenitor-Zellen aufweist. Hierbei war kein Unterschied der Wirkung von STI auf ALL-Blasten zu erkennen, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer Ph+ ALL oder zum Zeitpunkt eines Rezidivs der Ph+ALL entnommen wurden.

Obwohl unter der oben beschriebenen Kultivierungsmethode mittels herkömmlicher RT-PCR kein BCR-ABL-Nachweis mehr möglich war, zeigte sich ein positives Signal für BCR-ABL in allen Kulturen mittels „nested“ PCR. Bei der „nested“ PCR handelt es sich um eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von BCR-ABL mit der auch noch einzelne BCR-ABL positive Zellen innerhalb einer Zellkultur bestehend aus  $1 \times 10^7$  Zellen nachgewiesen werden können [Atta J et al., 1996]. Die klinische Relevanz dieser residuellen BCR-ABL-positiven Blasten ist unklar. Eine Quantitative Untersuchung der durch STI vermittelten Inhibition leukämischer Blasten war aufgrund begrenzter noch in Kultur befindlicher Zellen weder anhand FACS-Analyse noch durch morphologische Kriterien möglich.

Zum Überleben vereinzelter Ph+-ALL-Blasten kann weiterhin die Wachstumsstimulation mit Interleukin 3 beitragen: Von Interleukin 3 ist bekannt, dass es ähnlich wie BCR-ABL Signaltransduktionskaskaden stimuliert, die inhibierend auf die Apoptose wirken [Matulonis U et al., 1993; Goetz AW et al., 2001].

Neben der Inhibition des BCR-ABL-Proteins und der ABL-Kinase wirkt STI auch auf andere Proteine inhibierend. Beschrieben sind die Inhibition von PDGF [Druker B et

al., 1996], der ARG-Kinase [Okuda K et al., 2001] und c-kit [Buchdunger E et al 2000]. Durch die Inhibition der Stammzellfaktor-Rezeptors c-kit könnte STI neben seiner inhibierenden Wirkung auf Ph+ALL-Zellen erheblichen Einfluß auf das Überleben von normalen hämatopoetischen Stammzellen und Progenitor-Zellen nehmen. Eine durch STI vermittelte Wachstumsinhibition von hämatopoetischen Stammzellen wäre im klinischen Gebrauch von Nachteil und würde den klinischen Nutzen von STI einschränken. Um dies zu überprüfen legten wir nach einer 6-tägigen Kultivierungsperiode von primären Ph+ALL-Blasten mit STI klonogene Assays für hämatopoetische Progenitorzellen (CFU-Assays) und LTCIC-Assays (Long-Term Culture-Initiating Cell Assays) an. Der Kinase Inhibitor STI571 zeigte hierbei keinen Einfluß auf die Koloniebildung von Ph+ALL-Progenitor Zellen im Vergleich zur negativ-Kontrolle. Lediglich eine statistisch nicht relevante Reduktion der gesamten Kolonienzahl war in den Ansätzen, die STI enthielten, zu beobachten. Die LTCIC-Assays zeigten in den Kulturen, die zuvor mit STI gehalten worden waren, einen deutlichen Anstieg der Proliferation. Diese Beobachtung korreliert mit der bisher unbewiesenen Theorie, dass die herkömmliche ABL-Kinase im Gegensatz zu BCR-ABL eine proliferationsmindernde Wirkung aufweist. Die durch STI erreichte Inhibition von ABL in Verbindung mit der Wachstumsstimulation durch die zugegebenen Wachstumsfaktoren IL3 und G-CSF stimuliert somit die Entwicklung normaler hämatopoetischer Progenitor-Zellen und hämatopoetischer Stammzellen.

### 5.3 Beurteilung

Zusammenfassend ist STI571 ein potenter und spezifischer Inhibitor der ABL-Tyrosin-Kinase, unter dessen Wirkung es zu einer deutlichen Minderung der Proliferation von Ph+ ALL- Zelllinien kommt. Trotz der potenten Inhibition des BCR-ABL-Proteins und der daraus resultierenden Wachstumsinhibition ist unter der Wirkung von STI keine komplette Eradikation von Ph+ Zelllinien zu beobachten. Das Überleben einer kleinen Zellpopulation Ph+-Zellen in Kultur mit STI ist erklärbar durch eine kinetische Resistenz von in der G0-Phase befindlichen Zellen. Eine Selektion eines STI-resistenten Zellklons gelang durch kurzzeitige Kultur mit STI571 nicht.

In Kultur mit primären Ph+ALL-Blasten beweist sich STI als ein potenter Inhibitor unreifer Ph+ALL-Blasten, wie die Ergebnisse der RT-PCR-Versuche belegen. Trotz

der spezifischen Wirkung von STI sind aber auch in den Kulturen primärer ALL-Blasten zu jedem Zeitpunkt residuelle Ph<sup>+</sup> Zellen mittels einer hochsensitiven „nested“-PCR nachweisbar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um leukämische Zellen handelt, die zu einem Rezidiv der ALL führen können. Die Ergebnisse der klonogenen Assays und der LTCIC belegen, dass STI, trotz der Inhibition des Stammzellfaktor-Rezeptors c-kit, keinen selektiven inhibitorischen Einfluß auf die Viabilität und Proliferation von hämatopoetischen Progenitor-Zellen und Stammzellen hat.

### 5.4 Konsequenzen

Die hier beschriebenen Kultivierungsbedingungen erscheinen zur Elimination von leukämischen Blasten bei quantitativer und qualitativer Erhaltung normaler repopulationsfähiger Stammzellen, wie sie im klinischen Kontext einer klinisch autologen Transplantation erforderlich wären, nicht ausreichend. Die Persistenz einer kleinen Population von Leukämiezellen innerhalb der Zellkulturen wird belegt durch die Ergebnisse der nested PCR Untersuchung. Erklärbar ist diese Beobachtung durch die Tatsache, dass Ph<sup>+</sup>ALL Blasten, die sich zum Zeitpunkt der STI-Exposition in der Ruhephase (G<sub>0</sub>-Phase) befinden, eine Toleranz gegenüber der Wirkung von STI571 aufweisen [Graham SM et al., 2002]. Eine weitere Reduktion der residuellen Blasten ist möglicherweise durch zusätzliche Substanzen zu erreichen. Hierbei könnten verschiedene Substanzgruppen zur Anwendung kommen. Neben der Verwendung zytostatischer Substanzen ist die Inhibition weiterer flussabwärts gelegener Kinasegruppen denkbar. Auf pathophysiologischen Kenntnissen basierende Zielstrukturen wären beispielsweise die Janus Kinase [JAK] und das durch selbige aktivierte STAT3. Diese Signaltransduktionskaskaden unterliegen einer deregulierten Aktivierung durch das BCR-ABL Fusionsgen, so dass eine zusätzliche Inhibition selbiger sinnvoll erscheint. Das Tyrphostin AG490 ist ein spezifischer Inhibitor der Janus Kinase, der durch die Inhibition von JAK die Aktivierung von STAT3 verhindert. Bei der akuten lymphoblastischen Leukämie führt AG490 zu einer Wachstumsinhibition der leukämischen Zellen in vivo und in vitro [Meydan N et al., 1996]. Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen ist es deshalb denkbar, dass durch die Kombination von STI571 und AG490 eine weitere

Reduktion der residuellen Ph+ ALL-Blasten innerhalb der Kultur erreicht wird. Essentiell wäre bei zusätzlicher Inhibition der JAK-STAT Kaskade mittels AG490 wiederum die Untersuchung von potentiellen Effekten auf die Viabilität und Proliferation von normalen hämatopoetischen Progenitorzellen.

Darüber hinaus wäre die Kombination der Wirkung von STI mit einer zusätzlichen Inhibition der Protein-Farnesylation mittels des Farnesyl Transferase Inhibitors FTI SCH66336 (Lonafarnib) ein interessanter Ansatzpunkt, der zu einer weiteren Reduktion von Ph+ALL-Blasten führen könnte. Lonafarnib führt in Kombination mit STI571 bei BCR-ABL positiven Zelllinien, die eine Resistenz gegen STI571 aufweisen, zur erneuten Induktion der Apoptose und zur deutlichen Reduktion der Zellzahl [Hoover RR et al., 2002].

Abgesehen von der Wirkung des Kinase-Inhibitors auf Ph+ ALL-Blasten, ist eine weitere Voraussetzung für die Anwendung von STI571 im Rahmen eines Purgings das Fehlen einer Inhibition von normalen hämatopoetischen Progenitorzellen. In den beschriebenen Untersuchungen konnte zwar nachgewiesen werden, dass STI trotz Inhibition von c-kit in den Konzentrationen 1µM und 5µM keinen signifikanten negativen Einfluss auf die Viabilität und Proliferation normaler hämatopoetischer Progenitorzellen hat, ein potentieller Einfluss des Kinaseinhibitors auf das repopulative Potential dieser Zellen ist anhand der beschriebenen Versuche aber nicht auszuschliessen. Weitere Untersuchungen der Repopulationsfähigkeit nach Exposition gegenüber STI571 erscheinen unumgänglich, besonders vor dem Hintergrund einer potentiellen klinischen Anwendung des Verfahrens. Möglich wäre eine solche Untersuchung im NOD/SCID-Maus-Modell [Larochelle A et al., 1996, Roßmanith T et al., 2001].

Insgesamt erweist sich das Konzept der gezielten Inhibition von BCR-ABL durch STI571 auch in den präsentierten Versuchen, die auf eine Verwertung von STI571 im Rahmen eines Purgings abzielen, als interessant. Allerdings ist die Tatsache, dass ein kleiner Teil der Ph+ALL Blasten der Wirkung von STI571 entgeht, als problematisch anzusehen und eine Reaktivierung der ALL aus den residuellen Ph+ALL-Blasten denkbar. Ein alleiniges Purgung mittels STI571 erscheint aus diesem Grund nicht sinnvoll. Durch Kombination der Wirkung von STI mit anderen Substanzen wie AG490 oder Lonafarnib ist eine Eradikation der Ph+ALL Blasten denkbar. In diesem Fall erscheint eine weitere Untersuchung der durch die

Kombination der Substanzen erzielten Wirkung auf die Viabilität und das repopulative Potential normaler haematopoetischer Progenitorzellen unerlässlich.



## 6 Zusammenfassung

Die BCR-ABL positive akute lymphatische Leukämie ist die prognostisch ungünstigste Form aller akuten lymphatischen Leukämien. Pathogenetisch verantwortlich ist die reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosome 22 und 9. Das entstehende BCR-ABL-Fusionsprodukt führt durch eine Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden zur Proliferation und Unterdrückung der Apoptose.

STI571 ist ein Inhibitor der ABL-Tyrosinkinase mit der chemischen Struktur eines 2-Phenylaminopyrimidins. In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse von STI571 auf BCR-ABL positive Zelllinien und primäre Ph+ALL-Blasten untersucht. Ziel der Arbeit war es unter anderem zu untersuchen, ob STI571 auch in einer Purgung Situation zur Reduktion von leukämischen Blasten führt.

STI571 beweist sich als ein potenter und spezifischer Inhibitor der ABL-Tyrosinkinase, unter dessen Wirkung es zu einer deutlichen Inhibition des Wachstums von Ph+ Zelllinien kommt, die durch eine Reduktion der Zellproliferation und eine Zunahme der Apoptose zu erklären ist. Trotz der potenten Inhibition des BCR-ABL-Proteins und der daraus resultierenden Wachstumsinhibition ist unter der Wirkung von STI571 keine komplette Eradikation von Ph+ Zelllinien zu beobachten. Dieses Phänomen ist angesichts der kurzen Kultivierungsdauer nicht durch die Selektion eines resistenten Klons zu erklären.

Im Rahmen eines „in vitro Purgung Versuches“ erweist sich STI als ein potenter Inhibitor von primären unreifen Ph+ALL-Blasten. Trotz der spezifischen Wirkung von STI sind aber auch in den Kulturen primärer ALL-Blasten zu jedem Zeitpunkt residuelle Ph+ Zellen mittels einer hochsensitiven „nested“-PCR nachweisbar. Zur weiteren Reduktion der Ph+ ALL Blasten erscheint eine Kombination der Wirkung von STI571 mit anderen spezifischen Protein Inhibitoren wie zum Beispiel AG 490 oder Lonafamib ein pathophysiologisch begründeter Ansatzpunkt.

Da STI571 eine inhibierende Wirkung auf den Stammzellfaktorrezeptor c-kit aufweist, wurde eine mögliche Inhibition von hämatopoetischen Progenitor-Zellen untersucht. In CFU-GM-Kulturen und LTCIC-Kulturen ließ sich aber kein signifikanter Effekt auf die Viabilität und Proliferation von normalen hämatopoetischen Progenitorzellen beobachten.

## **7 Literatur**

Atta J, Martin H, Bruecher J, Elsner S, Wassmann B, Rode C, Russ A, Kvalheim G, Hoelzer D: Residual leukemia and immunomagnetic bead purging in patients with BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1996 Sep;18(3):541-8

Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M, et al.: Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306: 277-80, 1983

Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9: 1783-6, 1995

Ben-Neriah Y, Bernards A, Paskind M, Daley GQ, Baltimore D: Alternative 5' exons in c-abl mRNA. *Cell* 44: 577-86, 1986

Bernards A, Rubin CM, Westbrook CA, Paskind M, Baltimore D: The first intron in the human c-abl gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia. *Mol Cell Biol* 7: 3231-6, 1987

Blackburn P, Jaikhanani BL: Ribonuclease inhibitor from human placenta: interaction with derivatives of ribonuclease A. *J Biol Chem* 254: 12488-93, 1979

Blackburn P: Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay. *J Biol Chem* 254: 12484-7, 1979

Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, Lydon NB: Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 56: 100-4, 1996

Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB: Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *Pharmacol Exp Ther* 2000 Oct;295(1):139-45

Calabretta B, Skorski T.: BCR/ABL regulation of PI-3 kinase activity. *Leuk Lymphoma* 23: 473-6, 1996

Champlin RE, Golde DW. ; Chronic myelogenous leukemia: recent advances. *Blood* 65: 1039-47, 1985

Chan LC, Karhi KK, Rayter SI, Heisterkamp N, Eridani S, Powles R, Lawler SD, Groffen J, Foulkes JG, Greaves MF, et al.: A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 325: 635-7, 1987

Chien A, Edgar DB, Trela JM: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127: 1550-7, 1976

Chomczynski P: A Reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532-534, 1993

Chomczynski P, Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanat-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162: 156-159, 1987

Cortez D, Stoica G, Pierce JH, Pendergast AM: The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway. *Oncogene* 13: 2589-94, 1996

Daley GQ, Baltimore D: Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9312-16, 1988

de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Jove R, Koenderman L: STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 94: 1108-12, 1999

de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR: A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 300: 765-7, 1982

de Martynoff G, Pays E, Vassart G: Synthesis of a full length DNA complementary to thyroglobulin 33 S messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 93: 645-53, 1980

Demetri GD, von Mehren M et al.: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347: 472

Dhut S, Gibbons B, Chaplin T, Young BD: Establishment of a lymphoblastoid cell line, SD-1, expressing the P190 bcr-abl chimaeric protein. *Leukemia* 5: 49-55, 1991

Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2: 561-6, 1996

Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2: 561-6, 1996

Eder M, Ottmann OG, Hansen-Hagge TE, Bartram CR, Falk S, Gillis S, Hoelzer D, Ganser A: In vitro culture of common acute lymphoblastic leukemia blasts: effects of interleukin-3, interleukin-7, and accessory cells. *Blood* 79: 3274-84, 1992

Eichler DC, Tatar TF, Lasater LS: Effect of human placental ribonuclease inhibitor in cell-free ribosomal RNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 101: 396-403, 1981

Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L, Fanelli M, Bertazzoli C, Marchesi E, Di Nicola M, Biondi A, Corneo GM, Belotti D, Pogliani E, Lydon NB: Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 23: 380-94, 1997

Gerard GF, D'Alessio JM, Kotewicz ML, Noon MC: Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA* 5: 271-9, 1986

Gleissner B, Gokbuget N, Bartram CR, Janssen B, Rieder H, Janssen JW, Fonatsch C, Heyll A, Voliotis D, Beck J, Lipp T, Munzert G, Maurer J, Hoelzer D, Thiel E: Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* 99: 1536-43, 2002

Goetz AW, van der Kuip H, Maya R, Oren M, Aulitzky WE: Requirement for Mdm2 in the survival effects of Bcr-Abl and interleukin 3 in hematopoietic cells. *Cancer Res* 61: 7635-41, 2001

Goga A, McLaughlin J, Afar DE, Saffran DC, Witte ON: Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell* 82: 981-8, 1995

Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL: Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293: 876-80, 2001

Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, Holyoake TL: Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99: 319-25, 2002

Greil J, Gramatzki M, Burger R, Marschalek R, Peltner M, Trautmann U, Hansen-Hagge TE, Bartram CR, Fey GH, Stehr K, et al.: The acute lymphoblastic leukaemia cell line SEM with t(4;11) chromosomal rearrangement is biphenotypic and responsive to interleukin-7. *Br J Haematol* 86: 275-83, 1994

- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, Bartram C, de Klein A, Grosveld G: The human c-abl oncogene in the Philadelphia translocation. *J Cell Physiol Suppl* 3: 179-91, 1984
- Grosveld G, Verwoerd T, van Agthoven T, de Klein A, Ramachandran KL, Heisterkamp N, Stam K, Groffen J: The chronic myelocytic cell line K562 contains a breakpoint in bcr and produces a chimeric bcr/c-abl transcript. *Mol Cell Biol* 6: 607-16, 1986
- Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ: Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 96: 925-32, 2000
- Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J: Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 344: 251-3, 1990
- Hofmann WK, Jones LC, Lemp NA, de Vos S, Gschaidmeier H, Hoelzer D, Ottmann OG, Koeffler HP: Ph(+) acute lymphoblastic leukemia resistant to the tyrosine kinase inhibitor STI571 has a unique BCR-ABL gene mutation. *Blood* 99: 1860-2, 2002
- Honda H, Oda H, Suzuki T, Takahashi T, Witte ON, Ozawa K, Ishikawa T, Yazaki Y, Hirai H: Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human Ph1-positive leukemias. *Blood* 91: 2067-75, 1998
- Hoover RR, Gerlach MJ, Koh EY, Daley GQ: Cooperative and redundant effects of STAT5 and Ras signaling in BCR/ABL transformed hematopoietic cells. *Oncogene* 20: 5826-36, 2001
- Houts GE, Miyagi M, Ellis C, Beard D, Beard JW: Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. *J Virol* 29: 517-22, 1979

Ilaria RL Jr, Van Etten RA: P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 271: 31704-10, 1996

Jackson P, Baltimore D: N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl. *EMBO J* 8: 449-56, 1989

Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ: Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 4: 549-53, 1969

Joensuu H, Dimitrijevic S: Tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) as an anticancer agent for solid tumours. *Ann Med* 33: 451-5, 2001

Keeshan K, Mills KI, Cotter TG, McKenna SL: Elevated Bcr-Abl expression levels are sufficient for a haematopoietic cell line to acquire a drug-resistant phenotype. *Leukemia* 15: 1823-33, 2001

Kindler T, Breitenbuecher F, Marx A, Hess G, Gschaidmeier H, Gamm H, Kirkpatrick CJ, Huber C, Fischer T.: Sustained complete hematologic remission after administration of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate in a patient with refractory, secondary AML. *Blood* 2002 Dec 12; [epub ahead of print]

Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, Blodgett KP, Gerard GF: Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 35: 249-58, 1985

Le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R, Gambacorti-Passerini C: Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 95: 1758-66, 2000

Li S, Ilaria RL Jr, Million RP, Daley GQ, Van Etten RA: The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med* 189: 1399-412, 1999

Ludwig WD, Rieder H, Bartram CR, Heinze B, Schwartz S, Gassmann W, Löffler H, Hossfeld D, Heil G, Handt S, Heyll A, Diedrich H, Fischer K, Weiss A, Volkers B, Aydemir U, Fonatsch C, Gokbuget N, Thiel E, Hoelzer D: Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. *Blood* 92: 1898-909, 1998

Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV: Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor ST1571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 96: 1070-9, 2000

Martin H, Atta J, Zumpfe P, Eder M, Elsner S, Rode C, Wassmann B, Bruecher J, Hoelzer D: Purging of peripheral blood stem cells yields BCR-ABL-negative autografts in patients with BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol* 23: 1612-8, 1995

Matulonis U, Salgia R, Okuda K, Druker B, Griffin JD: Interleukin-3 and p210 BCR/ABL activate both unique and overlapping pathways of signal transduction in a factor-dependent myeloid cell line. *Exp Hematol* 21: 1460-6, 1993

Maurer J, Janssen JW, Thiel E, van Denderen J, Ludwig WD, Aydemir U, Heinze B, Fonatsch C, Harbott J, Reiter A, et al.: Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction. *Lancet* 337: 1055-8, 1991



McLaughlin J, Chianese E, Witte ON: Alternative forms of the BCR-ABL oncogene have quantitatively different potencies for stimulation of immature lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 9: 1866-74, 1989

McWhirter JR, Wang JY: Effect of Bcr sequences on the cellular function of the Bcr-Abl oncoprotein. *Oncogene* 15: 1625-34, 1997

Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM: Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a JAK-2 inhibitor. *Nature*: 645-8 1996

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-73, 1986

Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50, 1987

Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, Mosley B, March CJ, Urdal D, Gillis S: Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 333: 571-3, 1988

Nishigaki H, Ito C, Manabe A, Kumagai M, Coustan-Smith E, Yanishevski Y, Behm FG, Raimondi SC, Pui CH, Campana D: Prevalence and growth characteristics of malignant stem cells in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997 May 15;89(10):3735-44

Nishikawa S, Ogawa M, Nishikawa S, Kunisada T, Kodama: B lymphopoiesis on stromal cell clone: stromal cell clones acting on different stages of B cell differentiation. *Eur J Immunol* 11: 1767-71, 1988

Nowell Pc, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497, 1960

Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD: ARG tyrosine kinase activity is inhibited by ST1571. *Blood* 97: 2440-8, 2001

Palacios R, Stuber S, Rolink A: The epigenetic influences of bone marrow and fetal liver stroma cells on the developmental potential of Ly-1+ pro-B lymphocyte clones. *Eur J Immunol* 19: 347-56, 1989

Pegoraro L, Matera L, Ritz J, Levis A, Palumbo A, Biagini G: Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173). *J Natl Cancer Inst* 70: 447-53, 1983

Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, Schlessinger J, et al.: BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75: 175-85, 1993

Priest JR, Robison LL, McKenna RW, Lindquist LL, Warkentin PI, LeBien TW, Woods WG, Kersey JH, Coccia PF, Nesbit ME Jr. Philadelphia Chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 56: 15-22, 1980

Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, Arlinghaus R, Pawson T: Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 13: 764-73, 1994

Rolink A, Kudo A, Karasuyama H, Kikuchi Y, Melchers F: Long-term proliferating early pre B cell lines and clones with the potential to develop to surface Ig-positive, mitogen reactive B cells in vitro and in vivo. *EMBO J* 2: 327-36, 1991

Rowley JD: Chromosomal patterns in myelocytic leukemia. *N Engl J Med* 289: 220-1, 1973

Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH Jr, Erlich HA: Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 319: 537-41, 1988

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91, 1988

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-4, 1985

Sawyers CL, McLaughlin J, Witte ON: Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med* 181: 307-13, 1995

Scheele G, Blackburn P.: Role of mammalian RNase inhibitor in cell-free protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1898-902, 1979

Scheuring UJ, Pfeifer H, Wassmann B, Brueck P, Atta J, Petershofen EK, Gehrke B, Gschaidmeier H, Hoelzer D, Ottmann OG: Early minimal residual disease (MRD) analysis during treatment of Philadelphia chromosome/Bcr-Bbl positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL) with the Abl-tyrosine kinase inhibitor STI571 (Glivec). *Blood* 22: [epub ahead of print] 2002

Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315: 550-5, 1985

Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL: Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 13: 247-54, 1996

Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tsichlis PN, Calabretta B: Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 16: 6151-61, 1997

Skorski T, Kanakaraj P, Ku DH, Nieborowska-Skorska M, Canaani E, Zon G, Perussia B, Calabretta B: Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210bcr/abl: implication for RAS-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *J Exp Med* 179: 1855-65, 1994

Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak M, Szczyluk C, Zon G, Arlinghaus RB, Gewirtz A, Perussia B, Calabretta B: p120 GAP requirement in normal and malignant human hematopoiesis. *J Exp Med* 178: 1923-33, 1993

Stam K, Heisterkamp N, Grosveld G, de Klein A, Verma RS, Coleman M, Dosik H, Groffen J: Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 313: 1429-33, 1985

Strasser A, Rolink A, Melchers F: One synchronous wave of B cell development in mouse fetal liver changes at day 16 of gestation from dependence to independence of a stromal cell environment. *J Exp Med* 169: 1973-86, 1989

Suda T, Okada S, Suda J, Miura Y, Ito M, Sudo T, Hayashi S, Nishikawa S, Nakauchi H: A stimulatory effect of recombinant murine interleukin-7 (IL-7) on B-cell colony formation and an inhibitory effect of IL-1 alpha. *Blood* 74: 1936-41, 1989

Takeda S, Gillis S, Palacios R: In vitro effects of recombinant interleukin 7 on growth and differentiation of bone marrow pro-B- and pro-T-lymphocyte clones and fetal thymocyte clones.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 1634-8, 1989

Ten Hoeve J, Arlinghaus RB, Guo JQ, Heisterkamp N, Groffen J: Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. *Blood* 84: 1731-6, 1994

Voncken JW, Kaartinen V, Pattengale PK, Germeraad WT, Groffen J, Heisterkamp N: BCR/ABL P210 and P190 cause distinct leukemia in transgenic mice. *Blood* 86: 4603-11, 1995

Weisberg E, Griffin JD: Mechanisms of resistance imatinib (STI571) in preclinical models and in leukemia patients. *Drug Resist Updat* 4: 22-8, 2001

Whitlock CA, Tidmarsh GF, Muller-Sieburg C, Weissman IL: Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. *Cell* 48: 1009-21, 1987

Widmer MB, Morrissey PJ, Goodwin RG, Grabstein KH, Park LS, Watson JD, Kincade PW, Conlon PJ, Namen AE: Lymphopoiesis and IL-7. *Int J Cell Cloning*: 168-70, 1990

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung von ABL, BCR und der Bruchpunkte innerhalb der Breakpoint Cluster Region von BCR sowie der unterschiedlichen BCR-ABL-Konstrukte .....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung der durch das BCR-ABL-Konstrukt aktivierten Signalpfade. ....	6
Abb. 3: Strukturformel des ABL Tyrosinkinase-Inhibitors CGP57148 (STI571) .....	10
Abb. 4: Schematische Darstellung der Kultivierungsbedingungen im Assay zur Testung des Effektes von STI571 auf frühe ALL-Progenitorzellen. ....	26
Abb. 5: Einfluß von 1+10µM STI auf das Wachstum der Zelllinien BV173 (BCR-ABL-positiv) und SEM (BCR-ABL-negativ). ....	41
Abb. 6: 3H-Thymidin-Inkorporation der Zelllinien BV173 (BCR-ABL-positiv) und SEM (BCR-ABL-negativ) unter dem Einfluß des Kinase Inhibitors STI571. ....	42
Abb. 7: 7AAD-Apoptose-Assay der Zelllinien SEM und BV173. ....	43
Abb. 8: Wirkung von STI 571 auf das Wachstum der m-BCR-ABL Zelllinie SD1. ...	44
Abb. 9: Reexpositionversuch mit BV173. ....	46
Abb. 10: Reexpositionversuch mit SD1. ....	47
Abb. 11: Rt-PCR-Analyse der Expression von BCR-ABL während der Kultur primärer ALL-Blasten des Pat. C.H. ....	54
Abb. 12: Rt-PCR-Analyse der Expression von BCR-ABL während der Kultur primärer ALL-Blasten des Pat. P.V.....	55
Abb. 13: Rt-PCR-Analyse der Expression von BCR-ABL während der Kultur primärer ALL-Blasten des Pat. P.P.....	56
Abb. 14: Rt-PCR-Analyse der Expression von BCR-ABL während der Kultur primärer ALL-Blasten des Pat. R.G. ....	57
Abb. 15 Ergebnisse der „nested“ PCR der Patienten C.H. und P.P.....	59
Abb. 16 Klonierungseffizienz normaler hämatopoetischer Progenitorzellen nach 6-tägiger Suspensionskultur mit oder ohne 5µM STI571.....	62
Abb. 17 Einfluß des ABL-Tyrosinkinaseinhibitors STI571 auf normale LTCIC-abgeleitete CFC-GM.....	62

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämie .....	8
Tab. 2: Wirkung des Abl-Tyrosinkinase Inhibitors STI571 auf verschiedene Rezeptoren und Tyrosinkinasen .....	11
Tab. 3: Charakteristika der in den primären Zellkulturen verwendeten Patientenzellen .....	18
Tab. 4: Medium für BV 173 .....	21
Tab. 5: Medium für SD1 .....	21
Tab. 6: Medium für SEM .....	21
Tab. 7: Medium für NIH 3T3 .....	22
Tab. 8: Serumfreies Medium .....	24
Tab. 9: Langzeitmedium .....	28
Tab. 10: Mastermix für C-DNA-Synthese .....	33
Tab. 11: Mastermix für $\beta$ -Aktin-PCR .....	34
Tab. 12: Programm für $\beta$ -Aktin-PCR .....	35
Tab. 13: Mastermix für BCR-ABL-PCR .....	35
Tab. 14: Programm für BCR-ABL-PCR .....	36
Tab. 15: Mastermix für „nested“ BCR-ABL-PCR .....	37
Tab. 16: Programm für „nested“ BCR-ABL-PCR .....	37
Tab. 17 Charakteristika der Patienten und Übersicht über den immunologischen Phänotyp der in Kultur genommenen primären Zellen .....	49
Tab. 18: Übersicht über das Proliferationsverhaltens der kultivierten primären Ph+ALL-Blasten mit und ohne STI571 .....	51
Tab. 19: Ergebnisse der CFU-Assays. ....	61

## **Danksagung**

Besonders herzlich danke ich Herrn PD Dr. med. O. Ottmann für die Überlassung des interessanten Themas und für die hervorragende, stets freundliche und verständnisvolle Betreuung. Sein stetiges Interesse an meiner Arbeit und seine konstruktive Kritik waren essentiell für das Gelingen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. D. Hoelzer gilt mein herzlicher Dank für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes innerhalb des Labors und für die wissenschaftliche Anregung.

Frau Dr. rer. nat. Karin Ballas gilt mein besonderer Dank für die genaue und anschauliche Einführung in die verschiedenen Methoden.

Allen Labormitarbeitern danke ich für eine stets kollegiale wissenschaftliche Zusammenarbeit, die zur Motivation und Freude an der Arbeit wesentlich beigetragen hat. Insbesondere danke ich Herrn Dr. rer. nat. Uwe Kalina, Herrn Dr. med. Steffen Koschmieder, Herrn Dr. med. Johannes Atta, Herrn Dr. med. Stefan Klein, Frau Sandra Wagner, Frau Martine Pape und Frau Heike Brüggemolte.

Für die computertechnische Hilfe danke ich Herrn Dipl. Ing. Michael Hammer.

Für die Geduld und Hilfe bei der Korrektur danke ich meinen Eltern Dr. Dipl. Ing. Heinrich Brauns und Marie Luise Brauns sowie meiner Freundin Jacqueline Dadswell.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Tilmann Brauns  
Geboren am: 8.4.1972 in Bobingen  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Franziskanerstr.8a, 45139 Essen

### Schulbildung:

1978-80 Max-von-Gagern Grundschule, Kelkheim i. Ts.  
1980-82 Friedrich-Froebel Grundschule, Frankfurt/Niederrad  
1982-88 Lessing-Gymnasium, Frankfurt a. M.  
1988 Boston Grammar School, Boston/Lincolnshire/GB  
1989-91 Lessing-Gymnasium, Frankfurt a. M.  
Abitur und allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst:

1991-1992 Wehrdienst beim 2. Sanitätsbattalion in Marburg

### Hochschulbildung:

Seit 10/1992 Studium der Medizin an der Johann Wolfgang Goethe -  
Universität in Frankfurt a. M.  
19.4.1995 Ärztliche Vorprüfung mit der Note 2,6  
15.4.1996 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 3,0  
16.9.1998 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 2,6  
7.12.1999 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 1,0

### Promotion:

1996-2002 Experimentelle Doktorarbeit an der Klinik für Hämatologie und Onkologie mit dem  
Thema „Effekte des ABL-Tyrosinkinase-Inhibitors ST1571 auf BCR-ABL positive  
Blasten bei der akuten lymphatischen Leukämie“ unter der Leitung von Herrn PD  
Dr. med. O. Ottmann  
1996-1999 Labortätigkeit

### Praktisches Jahr:

1998-1999 Praktisches Jahr an der Johann Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt a.M.  
mit dem Wahlfach Dermatologie

### Arzt im Praktikum:

1/2000-6/2001 AiP an der Hautklinik der Universität Essen

### Assistenzärztliche Tätigkeit:

Seit 7/2001 Assistenzarzt an der Hautklinik der Universität Essen

### Auslandsaufenthalte:

1988 halbjähriger Aufenthalt in England mit Besuch der Boston Grammar School,  
Boston Lincolnshire  
1996 Famulatur in der Abt. für Radiologie der Universität von Virginia in  
Charlottesville/USA

### Sprachen:

Sehr gute Englischkenntnisse in Wort und Schrift  
Latein (Latinum) und Altgriechisch (Graecum)

### Preise:

Wissenschaftlicher Posterpreis der Dermatologischen Wissenschafts- und  
Fortbildungsakademie NRW für die Arbeit über C-KIT Expression in cutanen T-Zell  
Lymphomen (12/2002)

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Effekte des ABL-Tyrosinkinase-Inhibitors STI571 auf BCR-ABL positive Blasten bei der akuten lymphatischen Leukämie

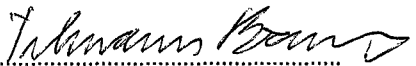
im Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik III, Hämatologie

unter Leitung von PD Dr. med. O. Ottmann

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 12. April 2003

  
.....  
Tilmann Brauns